

**Studie über die Wirkung kreislaufaktiver
Substanzen auf den Fettstoffwechsel und
die Entstehung der experimentellen
Arteriosklerose**

Vera Londong

1971



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553801_0035

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie
der Universität München

Direktor: Prof. Dr. Dr. E. Werle

Studie über die Wirkung kreislaufaktiver Substanzen auf den
Fettstoffwechsel und die Entstehung der experimentellen
Arteriosklerose

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Vera Londong geb. Schirren

aus Kiel

1971

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. H. Schievelbein
1. Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Dr. E. Werle
2. Mitberichterstatter:	Prof. Dr. G. Lange
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung: 12.10.1971	



DISSERTATIONS – und FOTODRUCK FRANK oHG
8000 München 2 · Gabelsbergerstr. 15 · Tel.: 2 80 90 90

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Einführung und Übersicht	1
B. Problemstellung	7
C. Material und Methoden	10
I. Tierversuche	10
1. Langzeitige Nikotinverfütterung an Kaninchen	10
2. Kinin- und Nikotin-Injektionen bei Hunden	11
3. Barbiturat-Narkose bei Hunden	12
II. Analytische Methoden	12
1. Plasma-Lipide	12
a) Freie Fettsäuren	12
b) Veresterte Fettsäuren	12
c) Cholesterin	12
d) Phosphatide	12
e) Gesamtlipide	13
2. Gaschromatographische Analyse der Fettsäuren	13
a) Methylierung freier Fettsäuren	13
b) Umesterung veresterter Fettsäuren	13
c) Hydrierung ungesättigter Fettsäuren	14
d) Betriebsbedingungen für die Gaschromatographie	14
e) Auswertung der Gaschromatogramme	14
III. Methodik zur Aktivitätsbestimmung der Lipoprotein-Lipase im Blut	15
1. Gewinnung von Post-Heparin-Plasma	15

	Seite
2. Herstellung von Substraten und Emul- gierungsversuche	15
a) Kokosfett	15
b) Fettgewebsfett	15
c) Synthetische Triglyceride	16
3. Bestimmung der Lipoprotein-Lipase-Aktivi- tät im Plasma	16
4. Prüfung der Eigenschaften der Lipoprotein- Lipase	17
IV. Bestimmung der Lipolyse im Fettgewebe	17
V. Statistische Methoden	18
D. Ergebnisse	20
E. Diskussion	41
F. Zusammenfassung	50
G. Literaturverzeichnis	52

A. Einführung und Übersicht

Herz-Kreislaufferkrankungen stehen in vielen Ländern an erster Stelle in der Statistik der Todesursachen mit ständig steigender Tendenz der Mortalitätsziffer. Besonders eindrucksvoll ist diese Entwicklung in Deutschland, wo sich die Zahl der Herzinfarkte seit 1956 verdreifacht hat. Als Ursache dafür vermutet man Änderungen der Lebensgewohnheiten (1), von denen vor allem eine unphysiologische Lebensweise mit Überernährung, gesteigertem Konsum tierischer Fette, chronischen Stresssituationen, Bewegungsarmut und Nikotinabusus diskutiert werden. Seit Durchführung der Framingham-Studie (2, 3) hat Rauchen als fraglicher Risikofaktor für die Entstehung der Arteriosklerose bzw. Koronarsklerose an Bedeutung gewonnen. Eine ihrer wesentlichen Aussagen war, daß Zigarettenraucher ein zwei- bis dreimal größeres Risiko tragen, einen Herzinfarkt zu erleiden, als Nichtraucher, Zigarren- oder Pfeifenraucher. GSELL (4) zieht in seinem Übersichtsreferat über die bisher vorliegenden epidemiologischen, retrospektiven und prospektiven Statistiken die Schlußfolgerung, daß eine eindeutige Beziehung zwischen Tabakrauchen und Herzinfarkt sowie der Mortalität an Koronarerkrankungen besteht. Besonders im jüngeren und mittleren Lebensalter ist chronisch stärkeres Rauchen als Risikofaktor des Herzinfarktes zu betrachten.

Eine Vielzahl wechselnder Theorien haben die von einer Intimaläsion ausgehenden pathogenetischen Vorstellungen der allgemeinen Arteriosklerose und damit auch der Koronarsklerose komplizierter gemacht, jedoch nicht erklärt. Aus der Anzahl der Theorien, die auf einer Störung des Fettstoffwechsels basieren (5), ist unschwer zu erkennen, daß den Lipoiden eine zentrale Bedeutung zukommt. Dafür sprechen auch die Erkrankungen, die als sichere Risikofaktoren der Arteriosklerose gelten - Diabetes mellitus, familiäre Fettstoffwechselstörung-

gen, Hyperlipämie, Hypothyreose, Adipositas, Gicht und arterielle Hypertonie. Im wesentlichen gilt für die Entstehung der Arteriosklerose immer noch die schon von VIRCHOW geforderte Trias: Veränderung der Strömungsdynamik des Blutes (Druckfaktor), Intimaläsion (Gefäßwandfaktor) und pathologische Zusammensetzung der corpuskulären und gelösten Bestandteile des Blutes (humoraler Faktor) (6).

Da das Nikotin auf jeden dieser drei Faktoren direkt oder indirekt einwirkt, ist es naheliegend, in diesem Bestandteil des Tabakrauches den eigentlichen Risikofaktor zu vermuten. Nikotin hat neben den verschiedenen pharmakologischen Wirkungen auf Herz und Kreislauf (periphere Vasokonstriktion mit Blutdrucksteigerung, Koronarerweiterung mit erhöhter O_2 -Utilisation) Einfluß auf das Blutgerinnungssystem einerseits durch Förderung der Thrombocytenaggregation (7), andererseits durch Verkürzung der Gerinnungszeit (8, 9). Eine Intimaschädigung durch Nikotin (10) und Tabakrauch (11) wurde mikroskopisch bzw. elektronenoptisch beobachtet. Von größter Bedeutung im Zusammenhang mit der Genese der Koronarsklerose scheint aber die Stoffwechselwirkung des Nikotins zu sein, die auf einer Aktivierung der Glykolyse und Lipolyse beruht (12, 13, 14). Zu dieser Kenntnis führten u.a. die Arbeiten von KERSHBAUM und Mitarb. (13), die 1961 erstmals berichteten, daß Zigarettenrauchen beim Menschen zu einer Erhöhung der Freien Fettsäuren (FFS) im Blut führt. Tierexperimentell konnten sie bei Hunden durch Nikotininfusionen den gleichen Effekt erzielen. Später wiesen die gleichen Autoren (14, 15) darüberhinaus beim Menschen nach Rauchen und bei Hunden nach Nikotininfusionen eine vermehrte Katecholaminausscheidung im Urin nach. MILTON (16) fand bestätigende Ergebnisse bei Katzen. So ist die Stoffwechselwirkung des Nikotins eine Katecholaminwirkung, da Nikotin selbst keinen Einfluß auf die Lipolyse des Fettgewebes hat, wie VERDY (17) am menschlichem Fettgewebe und

KERSHBAUM (18) an Rattennebenhodenfettgewebe zeigen konnten. - Heute gilt die lipolytische Wirkung des Nikotins über die sympatho-adrenale Stimulierung als gesichert (12, 19, 20, 21).

Welche Ausmaße die Stoffwechselwirkung der Katecholamine annehmen kann, ist der Arbeit von McKAY (22) zu entnehmen, der durch chronische Verabreichung von Katecholaminen eine Verfettung verschiedener Organe, insbesondere der Leber induzierte. Auch beim Phäochromocytom kommt es zur verstärkten Lipolyse mit Hyperlipazidämie (23). Weniger drastische Steigerungen der Lipolyse, die sich in einer Erhöhung der FFS im Plasma äußern, beobachtet man bei Stresssituationen verschiedenster Art wie Traumen, Frakturen und Operationen (24, 25, 26, 27, 28). Neuere Untersuchungen berichten über einen signifikanten Anstieg der FFS im Blut beim Myocardinfarkt (29) in zeitlicher und quantitativer Übereinstimmung mit einer erhöhten Katecholaminausscheidung (30). Der zu Grunde liegende Wirkungsmechanismus beruht wie bei allen lipolytischen Hormonen auf der Aktivierung der Adenylcyclase, die aus ATP cykliches AMP bildet, welches die inaktive Fettgewebslipase direkt aktiviert zur Spaltung von Triglycerid in Diglycerid und FFS (31). Insulin und Glukose gelten als physiologische Gegenregulatoren (32). Daraus erklärt sich der erhöhte FFS-Spiegel beim Insulin-Mangel und im Hunger (23).

Neben der beschriebenen Stoffwechselwirkung der Katecholamine, die möglicherweise bei der Genese der Arteriosklerose von Bedeutung ist, wird eine direkte Wirkung auf die Gefäßwand vermutet. RAAB (33) beobachtete bei Kaninchen nach Adrenalininjektionen eine Intimaverdickung und Mediasklerose. JOSUÉ (34) erzeugte in einer Langzeitstudie durch Adrenalininjektionen eine Mediaverkalkung der Aorta bei Kaninchen, die sogen. Adrenalinsklerose. Die Tatsache, daß 51% der Diabetiker an einer Koronarsklerose sterben, wird nicht allein auf die Fettstoffwechselstö-

rung zurückgeführt, sondern auf eine direkte Gefäßschädigung durch Katecholamine, die bei der Hypoglykämie des behandelten Diabetikers gegenregulatorisch ausgeschüttet werden (35).

Ob Nikotin weitere Störungen des Fettstoffwechsel verursacht, wurde von vielen Autoren untersucht. GOFMAN (36), KARVONEN (37), BRONTE-STEWART (38), THOMAS (39) und KANNEL (40) fanden bei Rauchern erhöhte Cholesterinwerte im Blut - allerdings übereinstimmend nur in der Altersgruppe von 20 bis 39 Jahren. Bei sehr Jungen und Alten fand sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich mit Nichtrauchern. EPSTEIN (41), HEYDEN (42) und BUTKUS (43) beobachteten keine Beeinflussung des Cholesterin-Spiegels im Blut durch Rauchen. Im Tierversuch konnten CZOCHRA-LYSANOWICZ (44), GROSGOGÉAT et al. (45) und WENZEL (46, 47, 48) nach Nikotinverabreichung eine Erhöhung des Cholesteringehaltes im Blut feststellen. - Der Triglyceridgehalt des Blutes wird durch Rauchen nur wenig beeinflusst. KERSHBAUM (13), BUTKUS (43), HEYDEN (42) und CRAMÉR (49) fanden bei Rauchern normale Werte, KONTTINEN (50) und ENGELBERG (51) leicht erniedrigte Werte. - Der Phospholipid-Spiegel ist nach BUTKUS (43) bei Rauchern nicht verändert. Dagegen beobachtete WENZEL et al. (46) bei Kaninchen, die bei cholesterinreicher Ernährung Nikotin erhielten, signifikant erhöhte Werte. - Über das Verhalten der Lipoprotein-Lipase des Blutes unter Nikotinkonsum liegen nur spärliche Ergebnisse vor. BECKER und NECHELES (52) fanden nach alimentärer Fettbelastung von rauchenden Koronarsklerotikern einen steilen Anstieg und einen verzögerten Abfall der Chylomikronen im Blut. Nach WHITE et al. (53) hemmt Nikotin die durch Heparin stimulierbare Kläraktivität des Serums in vivo und in vitro bei Ratten. Bedeutungsvoll scheint in diesem Zusammenhang, daß Arteriosklerosekranke und alte Menschen einen Mangel an heparinähnlichen Substanzen und an Lipoprotein-Lipase im Blut haben (54, 55).

Das Problem der experimentellen Arteriosklerose durch Nikotin wurde auf verschiedenste Weise untersucht. HASS et al. (56) konnten nur durch die Dreierkombination Nikotin, cholesterinreiche Diät und Vitamin D Überdosierung Gefäßverkalkungen erzeugen, während die entsprechende Kontrollgruppe keinerlei pathologische Gefäßwandveränderungen erkennen ließ. Dagegen wiesen GROSGOGEAT und ROUBELAKIS (57) bei Kaninchen, die zwei Monate lang täglich 2 x 15 mg Nikotin s.c. verabreicht bekamen, mikroskopisch und elektronenmikroskopisch Fröh-schäden an der Intima mit Mucopolysaccharidablagerungen und Spät-schäden an der Media mit Nekroseherden und Kalkablagerungen nach. In einer anderen Studie untersuchten GROSGOGEAT et al. (45) bei zusätzlicher cholesterinreicher Diät die Zusammensetzung der Blutlipide und der Lipide des Aortengewebes. Die makroskopisch unauffälligen Aorten zeigten mikroskopisch ein signifikant häufigeres Vorkommen einer Aortenfibrose. Der Gesamtlipid- und der Cholesteringehalt des Aortengewebes war in einigen Fällen erniedrigt. Der Gehalt an Cholesterin, α -Lipoprotein, β -Lipoprotein, Triglycerid und FFS im Blut war im Wesentlichen normal.

Insgesamt sind die bisherigen Untersuchungen der experimentell induzierten Arteriosklerose durch Nikotin unbefriedigend. Das liegt u.a. daran, daß extrem hohe oder viel zu niedrige Nikotindosen appliziert wurden. Die Versuchsdauer war in den meisten Fällen relativ zu kurz und die Kombination mit anderen atherogenen Faktoren wie cholesterinreicher Diät oder Vitamin D-Überdosierung komplizierend.

Nicht untersucht ist bisher die Frage, ob die Kinine als physiologische kreislaufaktive Substanzen wie andere biologisch aktive Peptide (58) lipolytische Eigenschaften haben und ob sie damit möglicherweise einen Einfluß auf die Entstehung der Arteriosklerose ausüben (59). Kinine sind Polypeptide, die durch proteolytische Enzyme wie Kallikrein von einem Eiweißkörper der α_2 -Globulinfraktion des Plasmas abgespal-

ten werden (59). Bradykinin setzt wie Nikotin Katecholamine aus dem Nebennierenmark (60, 61) und anderen peripheren Ganglien (62, 63) frei, jedoch nicht über eine Reizung der praeganglionären Faser, sondern durch direkte Wirkung auf die Ganglienzelle. Diese hat einen spezifischen Rezeptor für Kinine, der mit dem Rezeptor für Acetylcholin nicht identisch ist. Auch zentral-nervös wirkt Bradykinin durch Katecholaminfreisetzung im Gehirn; diese ist mit der durch Reserpin verursachten vergleichbar (64, 65). Kinine haben außerdem eine bronchokonstriktorische Wirkung, die durch Katecholamine hemmbar ist (66, 67). Bradykinin führt peripher zu einer Durchblutungssteigerung mit Blutdruckabfall, gefolgt von einem Blutdruckanstieg, der durch Katecholaminausschüttung bedingt ist (68). Nach COLLIER (67) stellt die durch Kinine verursachte Katecholaminfreisetzung ein wichtiges physiologisches Prinzip der Gegenregulation der Kininwirkung dar.

B. Problemstellung

1. Aus den bisher vorliegenden Ergebnissen tierexperimenteller Untersuchungen zur Frage Nikotin und Arteriosklerose läßt sich keine befriedigende Antwort, sondern nur ein Hinweis auf einen möglichen Zusammenhang entnehmen. In der vorliegenden Arbeit, die Teil einer durch ein Team bearbeiteten Studie ist (69, 70, 71), soll diese Frage erneut überprüft werden, besonders im Hinblick auf fettstoffwechselbedingte Gefäßwandveränderungen. Junge Inzuchtkaninchen werden täglich bei normaler Ernährung Nikotin als Trinkwasserzusatz erhalten. Im Laufe des Lebens werden die Fettstoffwechselmetabolite (freies und verestertes Cholesterin, FFS und veresterte Fettsäuren, Phosphatide und Gesamtlipide) im Blut bestimmt und mit der Kontrollgruppe verglichen (eigenen Untersuchungen). Nach 2 Jahren werden die Tiere getötet und feingeweblich auf Gefäßwandveränderungen untersucht (Untersuchungen A. Schauer und W. Londong) (69). Herz, Aorta und Leber werden außerdem auf den Gehalt an Gesamt-Lipiden, freiem und verestertem Cholesterin, FFS und veresterten Fettsäuren, Phosphatiden und Neutralfett untersucht (Dissertation V. Remplik) (70). In Herz, Aorta und Serum wird die qualitative Zusammensetzung der Fettsäuren gaschromatographisch bestimmt sowie der Calcium-Gehalt in Serum und Aorta analysiert (Untersuchungen H. Grumbach) (69). In Herz und Aorta wird außerdem die Lipoprotein-Lipase-Aktivität gemessen (Untersuchungen H. Gindele) (71).
2. In orientierenden Versuchen soll geprüft werden, ob der von COLLIER (67) postulierte physiologische Regelmechanismus zwischen dem Katecholamin- und Kininsystem durch seinen Einfluß auf die Fettsäureliberierung erkennbar ist.

Bei in-vivo-Versuchen wird narkotisierten Hunden Kallikrein i.v. und Kallidin intraaortal injiziert. Unter laufender Registrierung des intraarteriellen Druckes werden in regelmäßigen Zeitabständen Blutentnahmen zur Bestimmung der FFS durchgeführt. Die Kininwirkung wird mit einer nachfolgenden Nikotininjektion verglichen.

Da bei den mit Pentobarbital narkotisierten Hunden ein auffallend niedriger Gehalt an FFS im Blut beobachtet wird, soll der Narkoseeffekt auf den FFS-Spiegel im Blut untersucht werden.

In vitro wird an Schnitten vom Rattennebenhoden-Fettgewebe und an isolierten Fettzellen die lipolytische Eigenschaft von Kallidin, Bradykinin und Nikotin und ihr Einfluß auf die lipolytische Wirkung des Noradrenalins geprüft.

3. Es gibt bisher keine befriedigende Methode zur Bestimmung der Lipoprotein-Lipase-Aktivität im Blut, die ohne Aktivierung durch Heparin in vivo normalerweise kaum nachweisbar ist. Darum soll die allgemein angewandte Methode von SAILER, SANDHOFER und BRAUNSTEINER (72) überprüft und gegebenenfalls modifiziert werden. Da nach BENZONANA und DESNUELLE (73) die Aktivität der Pankreaslipase vom Emulgierungsgrad des angebotenen Substrates abhängig ist, soll durch Modifizierung des Substrates versucht werden, die Empfindlichkeit der Aktivitätsmessung der Lipoprotein-Lipase zu erhöhen.

Mit Hilfe verschiedener Substrate soll außerdem untersucht werden, ob die Plasma-Lipoprotein-Lipase Esterbindungen bestimmter Fettsäuren bevorzugt spaltet. Das Fettsäurespektrum der Substrate und der durch die Lipoprotein-Lipase abgespaltenen Fettsäuren wird dazu gaschromatographisch bestimmt. Hierdurch und durch die Testung verschiedener Substanzen auf ihren Einfluß auf die Aktivität der Lipoprotein-Lipase soll ein Beitrag zur Kenntnis der Eigenschaften dieses Enzyms gegeben werden. Insbesondere

soll untersucht werden, ob Nikotin einen Einfluß auf die Lipoprotein-Lipase-Aktivität hat.

C. Material und Methoden

I. Tierversuche

1. Langzeitige Nikotinverfütterung an Kaninchen

Weibliche, 6 Wochen alte Neuseelandkaninchen werden in eine Versuchsgruppe (35 Tiere) und eine Kontrollgruppe (15 Tiere) eingeteilt. In Einzelkäfigen erhalten die Versuchstiere 20 Monate lang werktags täglich zweimal, samstags und feiertags täglich einmal 1, 14 mg Nikotin/kg Körpergewicht in 50 ml Trinkwasser. Durch stundenweisen Trinkwasserentzug vor der Nikotिंगabe wird eine vollständige Aufnahme der angebotenen Dosis gewährleistet. Bei einigen Kaninchen wird 15 und 60 Min. nach Dosisaufnahme Blut entnommen und nach der Methode von SCHIEVELBEIN und GRUNDKE (74) auf den Nikotिंगehalt untersucht. Bei zwei Tieren wird 15 Min. nach Nikotinaufnahme im Mageninhalt die Nikotin-Konzentration gemessen.

Das Körpergewicht der Tiere wird monatlich kontrolliert und die Nikotin-Menge nach dem Durchschnittsgewicht neu berechnet.

Die Kontrolltiere erhalten ebenso wie die Versuchstiere nach Nikotinaufnahme Trinkwasser ad libidum.

Alle Tiere werden mit Standardfutter "Altromin K" der Fa. Altrogge (Wertbestandteile: Rohprotein 18, 2%, Rohfaser 13, 8%, Fett 4, 9%, Asche 7, 5%, N-freie Extraktstoffe 45, 2%) ernährt. Als zwei Monate nach Versuchsbeginn mehrere Tiere an Coccidiose erkranken, werden alle mit Sulfonamiden ("Ganda Vit^R") und Vitaminen ("Vitamin-Komplett^R") der Fa. Dr. Rentschler und Co. als Zusatz zum Trinkwasser behandelt. Drei Monate später wird eine parenterale Antibiotica-Therapie (100 mg Paraxin s.c. täglich) aller Tiere wegen einer Infektion der oberen Luftwege notwendig. Durch diese Seuchen und durch einzeln aufgetretene Tumoren des Magens,

der Orbita und der Ovarien und durch einige autoptisch nicht klärbare Krankheiten lebten nach 20 Monaten nur noch 20 Versuchstiere (57%) und 5 Kontrolltiere (33%). 10 gleichaltrige Kontrolltiere, die vom Züchter unter gleichen Ernährungsbedingungen gehalten worden waren, wurden gegen Ende des Versuches nachgeliefert und der Kontrollgruppe zugeordnet. 8, 12 und 20 Monate nach Versuchsbeginn wird den Kaninchen Ohrvenenblut entnommen und im Plasma der Gehalt an FFS und veresterten Fettsäuren, freiem und verestertem Cholesterin, Phosphatiden und Gesamtfett bestimmt.

2. Kinin- und Nikotin-Injektionen bei Hunden

Männliche Hunde verschiedener Rassen mit einem Körpergewicht von 8 bis 17 kg werden nach Entnahme von Nüchternblut i. v. mit 5 bis 10 ml Pentobarbital narkotisiert. Nach Intubation werden alle Tiere mit einer regulierbaren Pumpe für die Dauer des Versuches gleichmäßig beatmet. Der Blutdruck wird intraarteriell durch Anschluß der A. carotis an ein Ludwig'sches Quecksilbermanometer fortlaufend gemessen und auf einem berußten Kymographion registriert. Die Injektionen der Testsubstanzen Kallikrein, Kallidin und Nikotin erfolgte bei stabilem Kreislauf und konstantem Blutdruck von 120 bis 160 mm Hg. In regelmäßigen Zeitabständen vor und nach Injektion der Testsubstanzen wird Blut zur Bestimmung der FFS und bei einem Hund auch die für die Bestimmung des Cholesterins entnommen. Bei drei Hunden wird ein PVC-Dauerkatheter in die A. femoralis zur Injektion der Testsubstanzen Kallikrein und Nikotin gelegt. Ein Hund wird 8 Tage lang mit Reserpin vorbehandelt. Die i. p. Dosen werden der steigenden Empfindlichkeit des Tieres angepaßt (Tab. 1), ausgehend von einer maximalen Dosis von 0,2 mg/kg/die. Täglich wird morgens nüchtern Blut entnommen zur Bestimmung der FFS und des Cholesterins.

Bei zwei Hunden wird von der A. femoralis aus ein Aortenkatheter

bis oberhalb des Abganges der Aa. renales vorgeschoben. Er dient sowohl zur Injektion der Testsubstanzen Kallidin und Nikotin als auch zur Blutentnahme.

3. Barbiturat-Narkose bei Hunden

Bei 14 Hunden wird morgens nüchtern Blut aus der Cubitalvene entnommen. Bei 11 Hunden wird anschließend durch i.v. Injektion von 5 bis 10 ml Pentobarbital eine Narkose über mehr als drei Stunden durchgeführt. Bei einem Hund wird in regelmäßigen Abständen Blut entnommen, bei allen anderen 80 bis 90 Min. nach Narkosebeginn. Im frisch abzentrifugierten Plasma wird der Gehalt der FFS, bei einem Hund zusätzlich der Cholesterin-Gehalt bestimmt.

II. Analytische Methoden

1. Plasma-Lipide

- a) Freie Fettsäuren werden bei allen durchgeführten Experimenten nach der titrimetrischen Methode von DOLE (75) bestimmt. Nur für die Langzeitstudie der Nikotinverfütterung an Kaninchen wird aus Rationalisierungsgründen die einfachere Kupfer-Methode nach DUNCOMBE (76) gewählt.
- b) Veresterte Fettsäuren werden mit der Hydroxaminsäure-Methode nach GALETTI (77) bestimmt.
- c) Cholesterin: Freies und verestertes Cholesterin wird nach der Liebermann-Burchard'schen Reaktion nach der modifizierten Methode von WATSON (78) bestimmt.
- d) Phosphatide werden durch Bestimmung des mit Protein präzipitierten organischen Phosphors nach der Methode von WACHTER (79) bestimmt.

- e) Gesamtlipide werden mit der Vanillin-Methode nach CHABROL und CHAROUNAT (80) bestimmt.

2. Gaschromatographische Analyse der Fettsäuren

- a) Methylierung von FFS: In Anlehnung an die Methode von BURNS et al. (81) wird nach Beendigung der Titration der FFS nach DOLE (75) der Ansatz mit 1 ml 0,05 n H_2SO_4 erneut angesäuert und nach 10 Min. Schütteln 5 Min. bei 1000 U/Min. zentrifugiert. Die Heptanphasen der Doppelanalysen werden vereinigt und mit 1 ml 0,05 n NaOH in 50% Äthanol erneut geschüttelt und zentrifugiert. Die Heptanphase wird durch Absaugen mit der Wasserstrahlpumpe verworfen, während die die Fettsäuren enthaltende wässrige Phase mit 3 ml Pentan (99% Fa. Merck) gewaschen wird. Schließlich werden die Fettsäuren in 3 ml Pentan, die mit 1 ml 0,1 n H_2SO_4 angesäuert werden, extrahiert, in ein Spitzröhrchen überführt und unter Stickstoff eingedampft. Nach der Methode von EBERHAGEN (82) werden die Fettsäuren in 1 ml Petroläther gelöst und mit Diazomethan verestert.
- b) Umesterung veresterter Fettsäuren: 4,5 ml eines Folch-Sperry-Extraktes, der nach EBERHAGEN (82) aus 1 ml Plasma hergestellt wird, werden in eine Umesterungsapparatur nach DOSS und Oette (83) (Herstellung nach Muster der Fa. Ernst Zimmermann, Glas-technische Werkstätten Köln-Lindenthal) überführt. Nachdem man das Lösungsmittel vollständig unter Stickstoff abgedampft hat, löst man den Rückstand in 0,4 ml Chloroform, fügt 4 ml 0,5 n Na-Methylatlösung und Siedesteinchen zu. Nach Eintauchen des Kühlfingers wird in kochendem Wasserbad für 5 Min. erhitzt, abgekühlt, 4 ml einer 0,5 n HCl und 12 ml Aqua bidest. zugegeben und die Methylester mit 10 ml Petroläther/Diäthyläther (9:1) kräftig ausgeschüttelt. Nach Verwerfen der wässrigen Phase wird die Petrol-

ätherphase mit 5 ml Aqua bidest. gewaschen und mit einer Spatelspitze Natriumsulfat getrocknet.

- c) Hydrierung ungesättigter Fettsäuren: Nach der Methode von EBERHAGEN (82) spült man den bei der gaschromatographischen Analyse übriggebliebenen Rest der in Petroläther gelösten Fettsäuremethylester in die Hydrierapparatur nach EBERHAGEN (82) über und fügt eine Spatelspitze Palladiumkohle (10% Pd auf Aktivkohle, Fa. Fluka) und 5 ml Methanol (p.a. Fa. Merck) hinzu. In dem mit gereinigtem Wasserstoff gefüllten System wird unter Mischen mit einem Magnetrührer bei Normaldruck und konstanter Temperatur von 45°C für 90 Min. hydriert. Die Probe wird durch ein Faltenfilter (Schleicher und Schüll No 595 1/2, 7 cm Ø) in ein Spitzröhrchen filtriert und mehrmals mit Petroläther nachgewaschen, um die langkettigen Fettsäuren, die besonders stark an der Kohle haften, zu lösen. Am Rotationsverdampfer wird das Lösungsmittel bis zur Trockne abgedampft.
- d) Betriebsbedingungen für die Gaschromatographie: Gaschromatograph der Fa. F. & M. Typ 810, Flammenionisationsdetektor, silanisierte Glassäulen 1/8 inch x 8 ft., Säulenfüllung 10% Diäthylsuccinat auf Chromosorb W, AW - DMCS 100/120, Injektor-Temperatur 315°C, FID-Temperatur 365°C, Ofentemperatur programmiert 115-190°C (2°C/Min.), Trägergas He : 40 ml/Min., FID-H₂ : 40 ml/Min. Die Fettsäuremethylester, die nach den oben beschriebenen Methoden (II. 2. a bis II. 2. c) hergestellt werden, werden nach Abdampfen des Lösungsmittels unter Stickstoff in 0,2 bis 0,5 µl Petroläther aufgenommen und mit der Hamilton-Mikroliter-Spritze in die Gaschromatographiesäule injiziert.
- e) Auswertung der Gaschromatogramme: Die Identifizierung der einzelnen Fettsäuren erfolgte nach der von EBERHAGEN (82) beschriebenen Methode. Unter Berücksichtigung der durch die Analyse

von Fettsäure-Testgemischen ermittelten Korrekturfaktoren wird die Konzentration der individuellen Fettsäuren quantitativ berechnet.

Wiederauffindungsversuche mit Fettsäurestandardlösungen dienten der regelmäßigen Kontrolle der Methodik und ergaben ausreichende Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

III. Methodik zur Aktivitätsbestimmung der Lipoprotein-Lipase im Blut

1. Gewinnung von Post-Heparin-Plasma

Einem Hund wird 10 Min. nach i.v. Injektion von 50 I.E. "Heparin Novo"^R pro kg Körpergewicht Blut aus der V. cubitalis entnommen und mit 1 Tropfen Heparin pro 10 ml Blut ungerinnbar gemacht. Das Blut wird im Eisbad rasch abgekühlt und das durch Zentrifugation gewonnene Plasma in der Tiefkühltruhe bis zum Gebrauch konserviert.

2. Herstellung von Substraten und Emulgierungsversuche

- a) Kokosfett wird in Form von Palmin-Tafelfett gewogen und in Wasser und Normalplasma nach der Methode von SAILER et al. (72) bzw. in Polyvinylalkohol mit dem Ultra-Turrax emulgiert. Verwendung verschiedener Emulgierungszeiten, kurzes Abzentrifugieren von nicht emulgierten Teilchen und Analyse der Fettkonzentration im verwendeten Substrat durch gravimetrische Bestimmung führen zur Ermittlung des optimalen Substrates.

Zur Prüfung der Enzym-Substrat-Bindung wird nach Präinkubation mit Post-Heparin-Lipoprotein-Lipase für 30 Min. bei 25 000 U/Min. in der Ultrazentrifuge zentrifugiert und die hierdurch getrennten Phasen für sich auf den Gehalt an Lipoprotein-Lipase-Aktivität getestet.

- b) Fettgewebefett: Männliche Meerschweinchen werden durch Dekapi-

tierung entblutet und die Nebenhoden-Fettgewebepolster rasch präpariert, in gekühlter 0,9% NaCl-Lösung kurz gewaschen, mit Filterpapier getrocknet und die Fette extrahiert und gereinigt (84). Zur Herstellung des Substrates wird eine abgemessene Menge Petrolätherextrakt über Stickstoff bis zur Trockne eingedampft und in 1% Polyvinylalkohol im Ultra-Turrax für 3 Min. emulgiert. Die tatsächliche Fettkonzentration wird nach kurzem Abzentrifugieren von nicht emulgierten Teilchen durch Extraktion und gravimetrische Analyse ermittelt.

- c) Synthetische Triglyceride: Trilaurin, Trimyrustin, Tripalmitin und Tristearin von analytischem Reinheitsgrad werden eingewogen und in 1% Polyvinylalkohol für 3 Min. im Ultra-Turrax homogenisiert. Die Ermittlung der tatsächlichen Konzentration des emulgierten Triglycerids erfolgte nach der oben beschriebenen Weise (III. 2. b).

3. Bestimmung der Lipoprotein-Lipase-Aktivität im Plasma

Versuchsansatz: 0,5 ml Plasma (bei höheren Aktivitäten Plasmaverdünnung mit 0,9% NaCl); 0,1 ml 0,4 mol Tris pH 8,2; 1,0 ml Albumin 8%, pH 8,2; 0,4 ml Substrat (Herstellung siehe III. 2.). Inkubation 30 Min. unter mechanischem Schütteln bei 37°C im Wasserbad in Normalatmosphäre. Unterbrechen der Reaktion durch Extrahieren der FFS mit eisgekühltem Extraktionsgemisch nach der Methode von DOLE (75).

Leerwert: Zusammensetzung wie Versuchsansatz. Keine Inkubation. Das Substrat wird als Letztes nach Zusatz des Extraktionsgemisches der Probe beigegeben.

Berechnung: Die Lipoprotein-Lipase-Aktivität bzw. Post-Heparin-Lipoprotein-Lipase-Aktivität wird unter Berücksichtigung des Leerwertes in Internationalen Einheiten (I.U. = $\mu\text{mol FFS/Min/Liter}$) berechnet.

4. Prüfung der Eigenschaften der Lipoprotein-Lipase

Mit dem Substrat, mit dem höchste Enzymaktivität gemessen wird, wird bei Substratsättigung (Kokosfett 0,2% Endkonzentration, emulgiert für 3 Min. in 1% Polyvinylalkohol) die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit vom pH, von der Temperatur und der Zeit untersucht.

Desgleichen wird unter optimalen Bedingungen die Korrelation zwischen steigenden Mengen Plasma-Enzym und freigesetzten Mengen Fettsäuren bestimmt. Die ermittelte Korrelationsgerade wird mit der nach der Methode von SAILER et al. (72) (Kokosfett 6% Endkonzentration, emulgiert und "aktiviert" durch Normalplasma) festgelegten verglichen.

Aktivierungsversuche der Lipoprotein-Lipase werden durch Zusatz von Desoxycholat (3×10^{-3} bis 3×10^{-2} Mol/Liter), 3'-5'-AMP (1×10^{-5} bis 5×10^{-5} Mol/Liter) und Nikotin (1×10^{-3} bis 6×10^{-3} Mol/Liter) durchgeführt. Hierzu werden die Substanzen in 0,4 mol Tris pH 8,2 gelöst und unter sorgfältiger Kontrolle des pH-Wertes vor Zugabe des Substrates dem Inkubationsansatz zugemischt.

Fettsäureanalysen von Kokosfett und Meerschweinchen-Nebenhodentfettgewebefett und von den aus diesen Substraten durch Lipoprotein-Lipase freigesetzten Fettsäuren erfolgte mit der unter II.2. beschriebenen gaschromatographischen Methode.

IV. Bestimmung der Lipolyse im Fettgewebe

Als Testorgan dient Ratten-Nebenhodentfettgewebe, das geschlechtsreifen Tieren nach Dekapitierung durch sorgfältige Präparation entnommen wird. Die Fettpolster werden in Krebs-Ringer-Bikarbonatpuffer pH 7,4 gewaschen, auf Fließpapier abgelöscht und entweder im geschlossenen Gewebsverband oder als isolierte Fettzellen verwendet. Die Inkubation erfolgt unter mechanischem Schwenken in

normaler Atmosphäre im Wasserbad bei 37°C für 30 Min. Als Inkubationsmedium dient Krebs-Ringer-Bikarbonatpuffer pH 7,4 mit 2 bzw. 4% Rinderalbumin Fraktion V. Die zu testenden Substanzen Kallidin (Standard-Kinin: Rinderplasma + Schweine-Submaxillaris-Kallikrein, 20 E/ml; 1 E = 60 µg), Bradykinin ("Synthetic Bradykinin" SANDOZ BRS 640 Batch 63009, 80 µg/ml) und Nikotin werden im gleichen Puffer gelöst. Die während der Inkubation freigesetzten Fettsäuren dienen als Gradmesser für die lipolytische Aktivität. Sie werden nach Unterbrechen der Reaktion durch rasches Abkühlen, Filtrieren und Extrahieren nach der Methode von DOLE (75) bestimmt. Unter Berücksichtigung des Leerwertes wird die lipolytische Aktivität in mval FFS/g Gewebe bzw. Fett berechnet.

Fettgewebsschnitte: 300 - 350 mg Fettpolster werden in 50 mg große Stücke geschnitten und direkt in ein Inkubationsgefäß eingewogen. Nach Zusatz von 6 ml Inkubationsmedium mit 2% Albumin wird zur Zeit Null 1 ml Medium zur Bestimmung des Leerwertes entnommen.

Isolierte Fettzellen: Nach der Methode von RODBELL (85) werden die Fettzellen durch Inkubation der Fettpolster mit Kollagenase aus dem Gewebsverband gelöst, mit Albumin-Krebs-Ringer-Puffer gewaschen und durch differenzierte Zentrifugation isoliert. Nach mikroskopischer Kontrolle der Zellmorphie wird 1 ml Zellsuspension (ca. 500 mg Fett) in 10 ml Inkubationsmedium mit 4% Albumin inkubiert. Zur Zeit Null werden 3,5 ml Inkubationsansatz entnommen, zellfrei filtriert und in einem aliquoten Teil des Filtrates der Fettsäuregehalt zur Ermittlung des Leerwertes bestimmt.

V. Statistische Methoden

Die statistische Auswertung der Befunde der langzeitigen Nikotinwirkung bei Kaninchen wurde von Herrn Prof. Dr. H. Immig, Deut-

ches Krebsforschungszentrum Heidelberg, nach der Methode der Varianz-Analyse durchgeführt (69).

D. Ergebnisse

1. Langzeitige Wirkung von Nikotin bei Kaninchen

Nikotin-Resorption: 15 bis 60 Min. nach einer einmaligen oralen Aufnahme von 1, 14 mg Nikotin/kg Körpergewicht in insgesamt 50 ml Trinkwasser beträgt der Nikotingehalt des Blutes 0,2 bis 0,03 µg/ml. Im Mageninhalt waren nach 15 Min. noch ca. 50% des verabreichten Nikotins nachzuweisen, während im Stuhl und Urin nur Spuren gefunden wurden.

Körpergewicht: Die Versuchs- und Kontrollgruppe zeigen eine normale gleichgroße Zunahme des Körpergewichtes während des Lebens. Bei Versuchsende beträgt das Durchschnittsgewicht für die Nikotin-behandelten Tiere 4,22 kg und für die Kontroll-Tiere 4,04 kg.

Blutlipide: Gesamtlipide, verestertes Cholesterin, Phosphatide und veresterte Fettsäuren steigen in beiden Gruppen zu einem Maximum nach 12 Monaten an, um nach 20 Monaten wieder im Bereich der Ausgangswerte zu liegen. Nur in Bezug auf das Alter besteht eine statistische Signifikanz ($P = 0,01$ (Abb. 1).

Die Mittelwerte der FFS sind bei der Nikotin-Gruppe nach 8 Monaten doppelt so hoch wie bei der Kontrollgruppe, nach 12 Monaten etwa ein Drittel höher und bei Versuchsende nach 20 Monaten gleich hoch (Abb. 1). Es besteht jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied ($P > 0,1$).

2. Wirkung von Kininen und Nikotin auf die Lipolyse

In-vivo-Versuche an narkotisierten Hunden: Nach einer Einzeldosis von 0,5 bis 5,0 KE Kallikrein i.v. steigen die FFS im Blut geringgradig aber deutlich an; die nachfolgende Dosis von 300 µg Nikotin

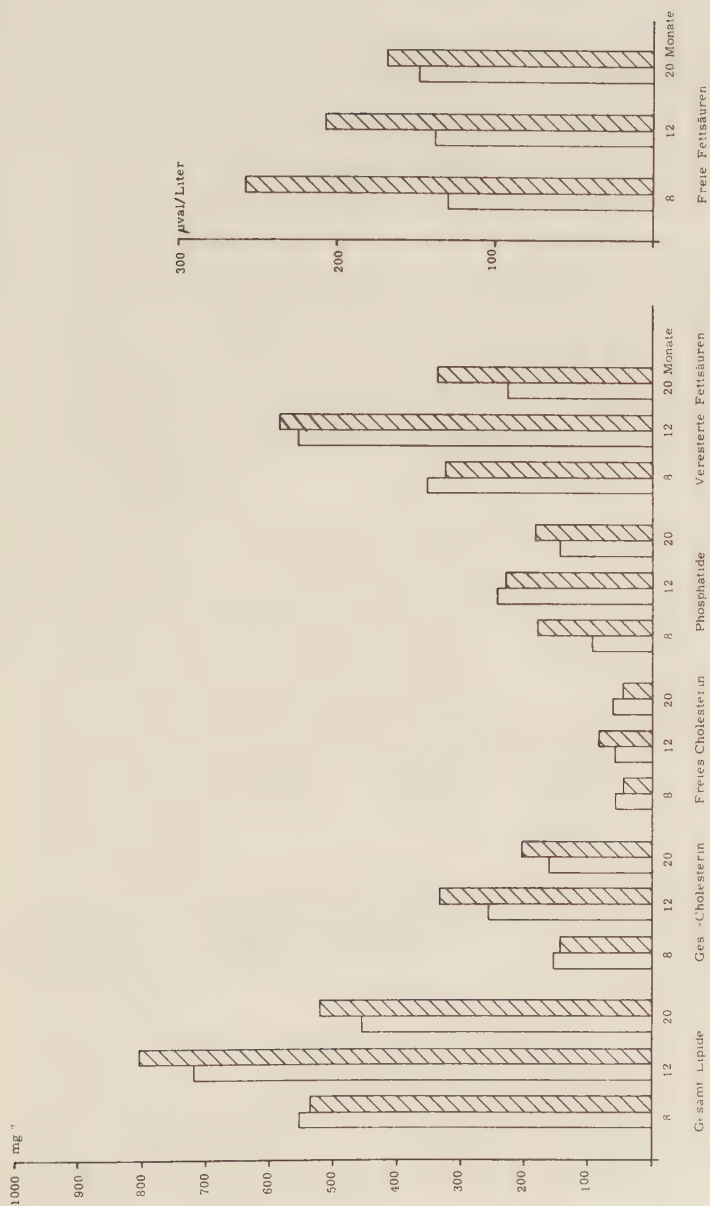


Abb. 1 Mittelwerte der Konzentration der Blutlipide (Gesamt-Lipide, Gesamt-Cholesterin, Freies Cholesterin, Phosphatide, Veresterte Fettsäuren und FFS) nach 8, 12 u. 20 Monate langer Nikotin-Verfütterung bei Kaninchen.

Offene Säulen: Kontrollgruppe
 Schraffierte Säulen: Nikotingruppe

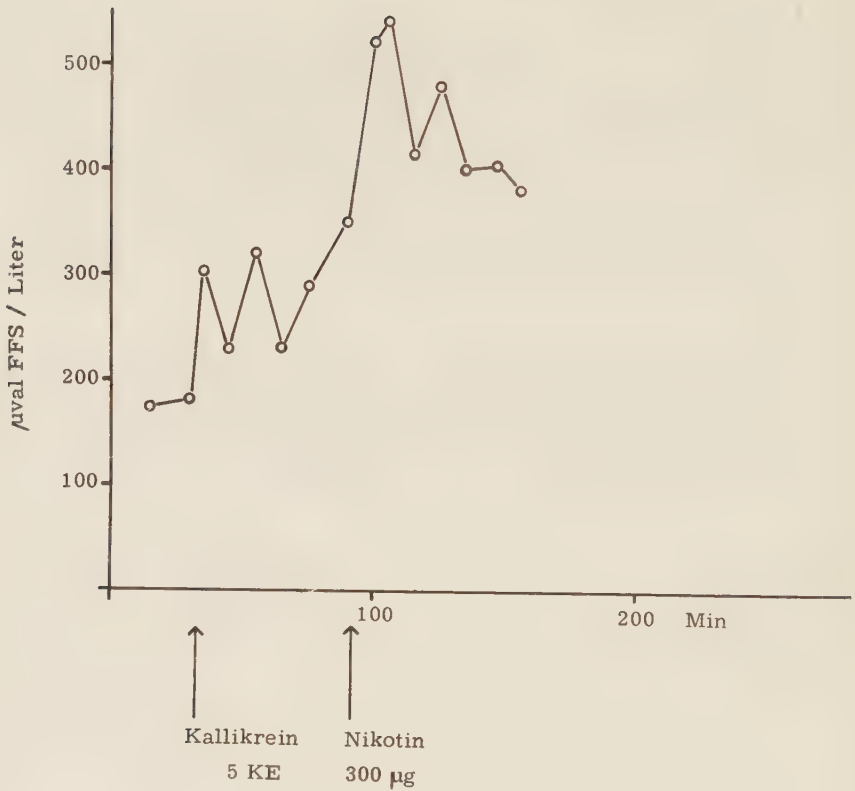


Abb. 2: Wirkung einer Einzeldosis Kallikrein, i.v. verabreicht, auf den FFS-Spiegel des Blutes im Vergleich mit nachfolgend injiziertem Nikotin bei einem Hund (Gewicht 8 kg) in Pentobarbital-Narkose.

bewirkt einen weiteren Anstieg der FFS, der jedoch nicht über den oberen Normbereich (Tab. 2) des FFS-Spiegel im Blut hinaus geht. In Abb. 2 ist ein repräsentatives Beispiel dargestellt. Unter einer achttägigen Serpasil-Behandlung sinkt der Nüchtern-

FFS-Spiegel mit niedrigsten Werten am dritten und sechsten Tag deutlich ab. Auch die Cholesterinwerte sind z.T. stark erniedrigt, haben allerdings nach acht Tagen ihren Ausgangswert wieder erreicht (Tab. 1). Eine protrahierte i.v. Injektion von 7 KE Kallikrein bewirkt beim Serpasil-behandelten Hund keinen signifikanten Anstieg der FFS im Blut. Der Blutdruck wird durch Kallikrein in bekannter Weise gesenkt (in 35 Min. elfmal von 140 auf 100 mm Hg). Der Wiederanstieg des Blutdrucks dauert beim Serpasil-behandelten Hund nicht länger als beim unbehandelten Hund. Die nachfolgende Dosis von 200 μ g Nikotin hebt den Blutdruck auf 160 mm Hg an, verändert den FFS-Spiegel aber nicht. Der Cholesterin-Gehalt des Blutes wird weder durch Kallikrein noch durch Nikotin beeinflusst (Abb. 3).

Nach intraortaler Injektion von 305 E Kallidin steigt der arterielle Blutdruck vorübergehend stark an, eine Veränderung des FFS-Spiegels im Blut wird aber nicht beobachtet. Aus nachfolgend injiziertem Nikotin (100 μ g) resultiert das gleiche Verhalten (Abb. 4). Wesentlich höhere Dosen (680 E Kallidin bzw. 1700 μ g Nikotin) verursachen ein leichtes Absinken der FFS und einen kurzfristigen starken Blutdruckanstieg, der über einen allmählichen Blutdruckabfall dann zum Exitus des Tieres führt (Abb. 5).

Tab. 2 läßt erkennen, daß der durchschnittliche Gehalt der FFS im Nüchternblut nicht narkotisierter Hunde bei 536 mval/L liegt, während er bei narkotisierten Hunden mit 370 mval/L deutlich niedriger liegt. Der Effekt der Pentobarbital-Narkose auf die FFS im Blut ist in Abb. 6 und 7 dargestellt. Bei sechs von sieben Hunden kommt es zu einem deutlichen Abfall der FFS. Nur bei einem Hund wird ein geringer Anstieg von 6% gemessen (Abb. 6). Das Verhalten des FFS-Spiegels im Blut im Verlauf der Narkose eines Hundes ist

Tag	Serpasil (Dosis mg)	Freie Fettsäuren (μ val/Liter)	Cholesterin (mg%)		
			Freies	Verestertes	Gesamtes
0.	-	594	-	-	-
1.	2,5	-	-	-	-
2.	-	425	-	-	234
3.	1,8	341	28	125	153
4.	1,8	405	47	100	147
5.	-	490	36	83	120
6.	-	341	39	61	100
7.	1,8	456	50	134	184
8.	-	418	52	152	204

Tab. 1 Verhalten des FFS- und des Cholesterin-Spiegels im Blut eines mit Reserpin behandelten Hundes (Gewicht 12 kg).

in Abb. 7 dargestellt. Innerhalb der ersten 30 Min. nach Narkosebeginn steigen die FFS um die Hälfte des Ausgangswertes an, um dann bereits nach 90 Min. auf die Hälfte des Ausgangswertes abzufallen. Auf diesem niedrigen Niveau bleiben sie für mindestens weitere 80 Min.

In-vitro-Versuche an Fettgewebsschnitten und isolierten Fettzellen:

An Rattennebenhoden-Fettgewebsschnitten wird die durch Noradrenalin stimulierbare Lipolyse durch Kallidin nicht, durch Bradykinin anscheinend geringgradig aktiviert. Die durch Noradrenalin stimulierte Lipolyse wird von beiden Kininen weder aktiviert noch gehemmt (Tab. 3).

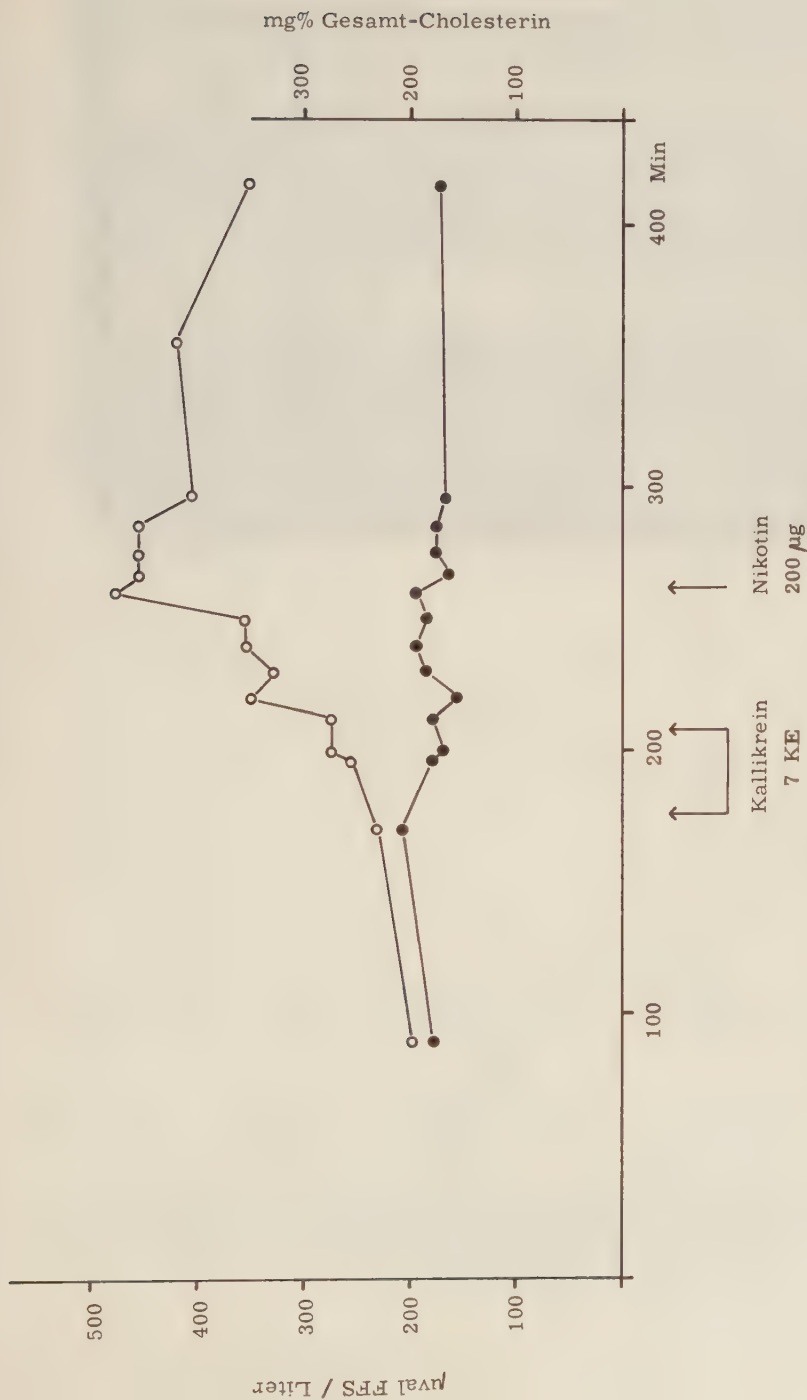


Abb. 3 Wirkung von i. v. protrahiert verabreichtem Kallikrein und Nikotin auf den FFS- und Cholesterin-Spiegel des Blutes beim Reserpin-behandelten Hund (Gew. 12 kg).

○ FFS
● Ges.-Cholesterin

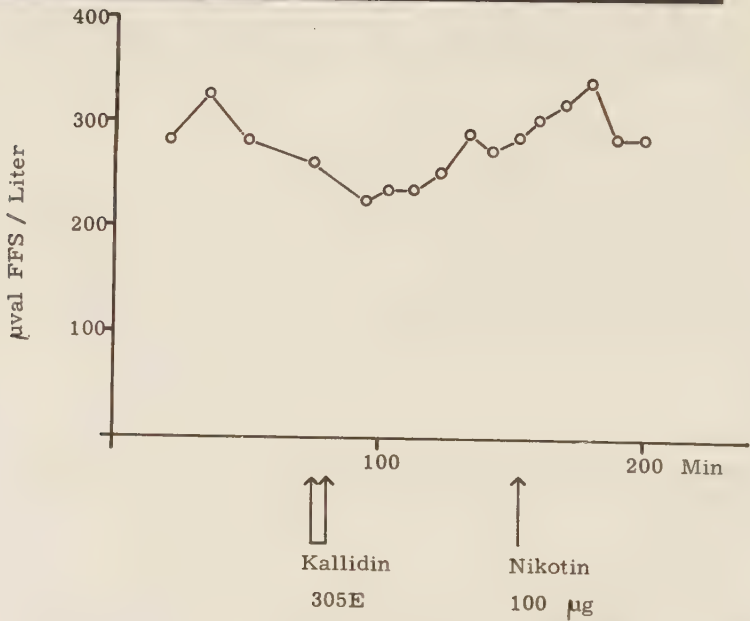
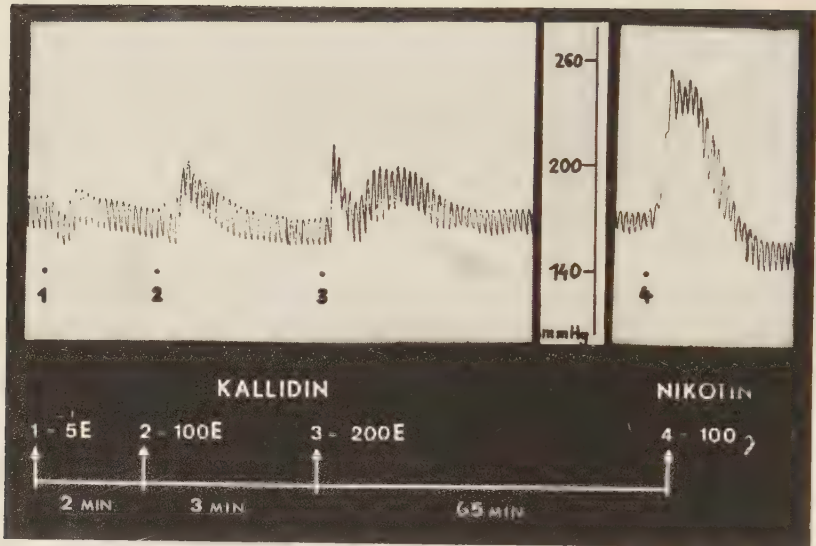


Abb. 4 Wirkung von intraaortal injiziertem Kallidin und Nikotin auf den Carotis-Blutdruck und den FFS-Spiegel des Blutes beim Hund (Gewicht 14 kg) in Pentobarbital-Narkose.

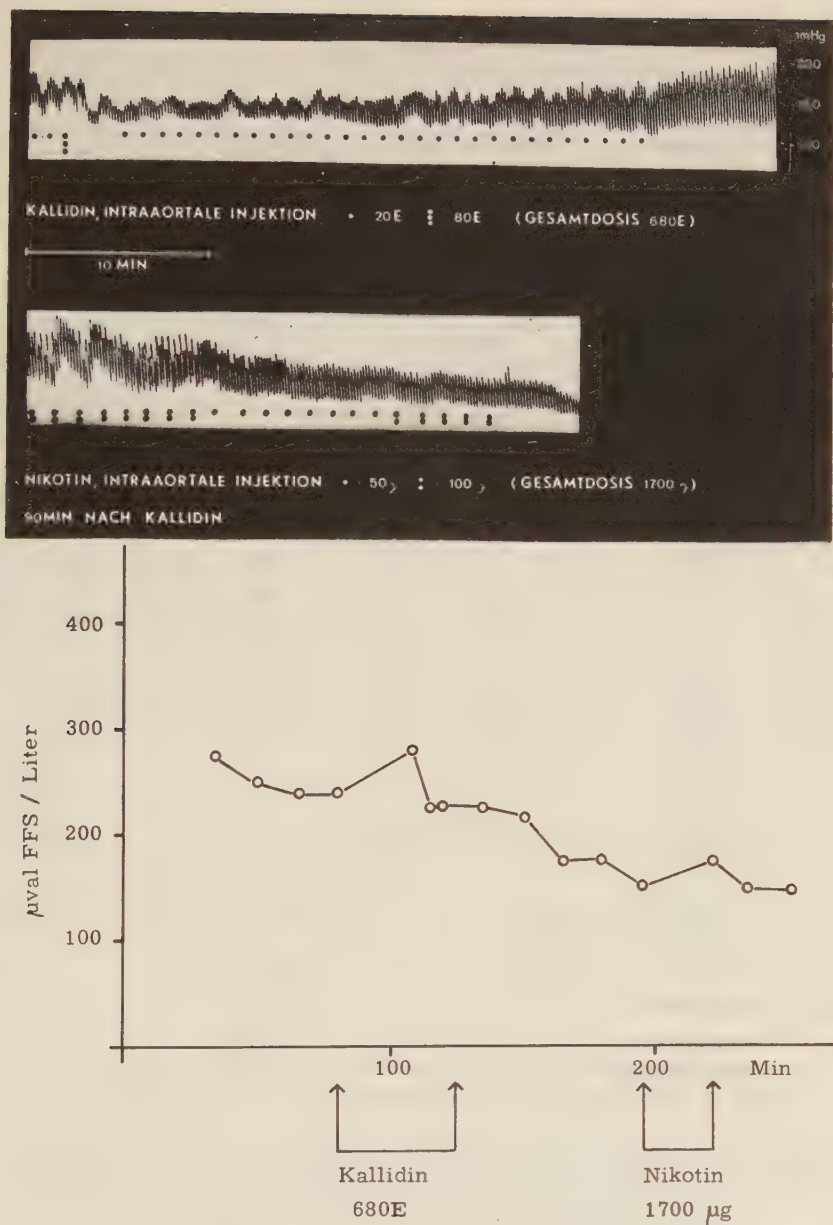


Abb. 5 Wirkung von intraaortal protrahiert injiziertem Kallidin und Nikotin auf den Carotis-Blutdruck und den FFS-Spiegel des Blutes beim Hund (Gewicht 15 kg) in Pentobarbital-Narkose.

Hund No.	Freie Fettsäuren im Plasma (μ val/Liter)	
	nüchtern	in Narkose
I	374	337
II	349	209
III	542	374
IV	925	762
V	822	872
VI	320	175
VII	420	200
VIII	-	295
IX	-	334
X	-	240
XI	-	280
XII	360	-
XIII	615	-
XIV	783	-
XV	320	-
XVI	594	-
XVII	280	-
XVIII	805	-
Mittelwert ($\bar{x}$)	536	370
Standard- abweichung (S)	221	230

Tab. 2 Konzentration der Freien Fettsäuren im Plasma von Hunden nüchtern (n = 14) und in Narkose (n = 11) (80 - 90 Min nach Narkosebeginn).

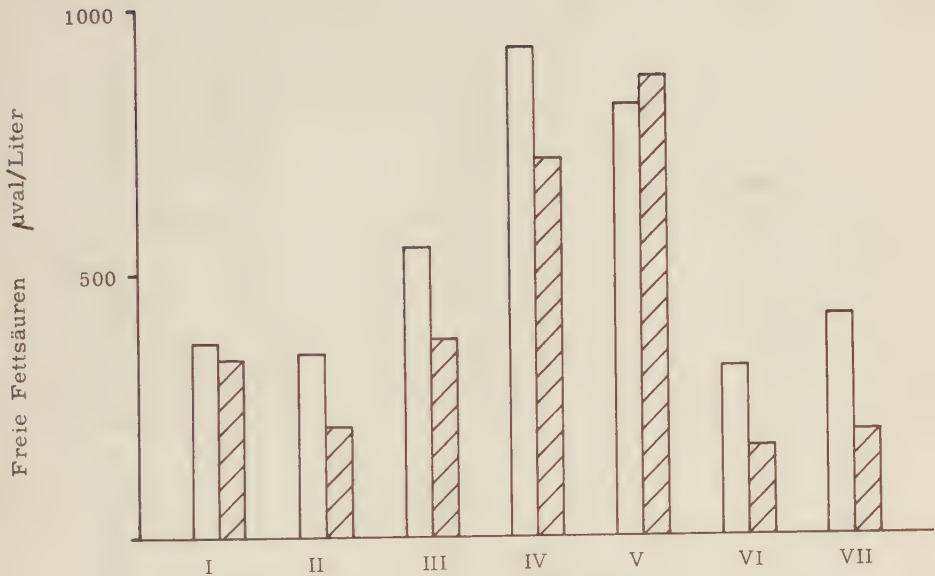


Abb. 6 Einfluß der Pentobarbital-Narkose auf den FFS-Spiegel im Blut bei Hunden.
Offene Säulen: Nüchtern
Schraffierte Säulen: 80 - 90 Min nach Narkosebeginn

An isolierten Fettgewebszellen aus Rattennebenhoden-Fettgewebe, die ein einheitlicheres Testobjekt als Gewebsschnitte darstellten und deshalb besser reproduzierbare Ergebnisse gewährleisteten, hat Kalbidin keine lipolytische Wirkung und keine aktivierende oder hemmende Wirkung auf die durch Noradrenalin stimulierte Lipolyse (Tab. 4).

Nach Inkubation mit Gewebsschnitten oder Fettzellen waren die ge-

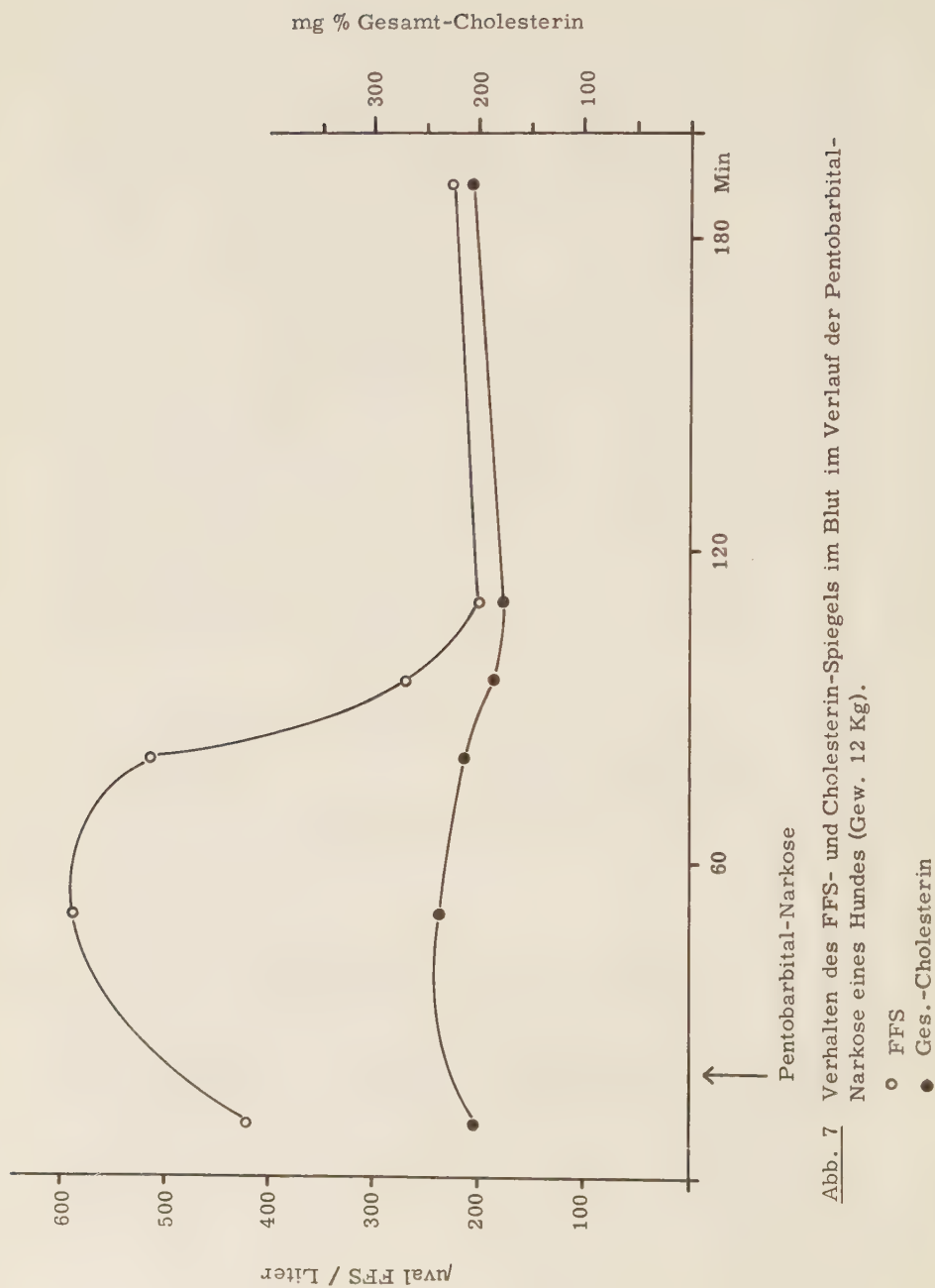


Abb. 7 Verhalten des FFS- und Cholesterin-Spiegels im Blut im Verlauf der Pentobarbital-Narkose eines Hundes (Gew. 12 Kg).

○ FFS

● Ges.-Cholesterin

Zusatz	Konzentration	mval FFS/g Gewebe
-	-	0,59
		0,86
Noradrenalin	$4,9 \times 10^{-6}$ mol	1,87
		2,95
Noradrenalin	$5,1 \times 10^{-6}$ mol	2,03
		1,81
Noradrenalin	$7,6 \times 10^{-6}$ mol	4,25
		5,75
Kallidin	770 E/Liter = 46,2 mg	0,36
		0,30
Kallidin +	770 E/Liter = 46,2 mg	2,09
Noradrenalin	+ $5,1 \times 10^{-6}$ mol	1,89
Bradykinin	3,1 mg/Liter	1,40
		1,23
Bradykinin +	3,1 mg/Liter	2,27
Noradrenalin	+ $5,1 \times 10^{-6}$ mol	2,27

Tab. 3 Wirkung von Kallidin und Bradykinin auf die durch Noradrenalin stimulierbare Lipolyse an Fettgewebsschnitten (Rattennebenhoden-Fettgewebe).

Zusatz	Konzentration	mval FFS/g Fett
-	-	1,8
		1,8
Noradrenalin	$1,2 \times 10^{-6}$ mol	21,5
		21,5
Kallidin	2000 E/Liter	1,8
		1,8
Noradrenalin +	$1,2 \times 10^{-6}$ mol	22,3
Kallidin	+ 1600 E/ml	22,8

Tab. 4 Wirkung von Kallidin auf die durch Noradrenalin stimulierbare Lipolyse an isolierten Fettzellen (Rattennebenhoden-Fettgewebe).

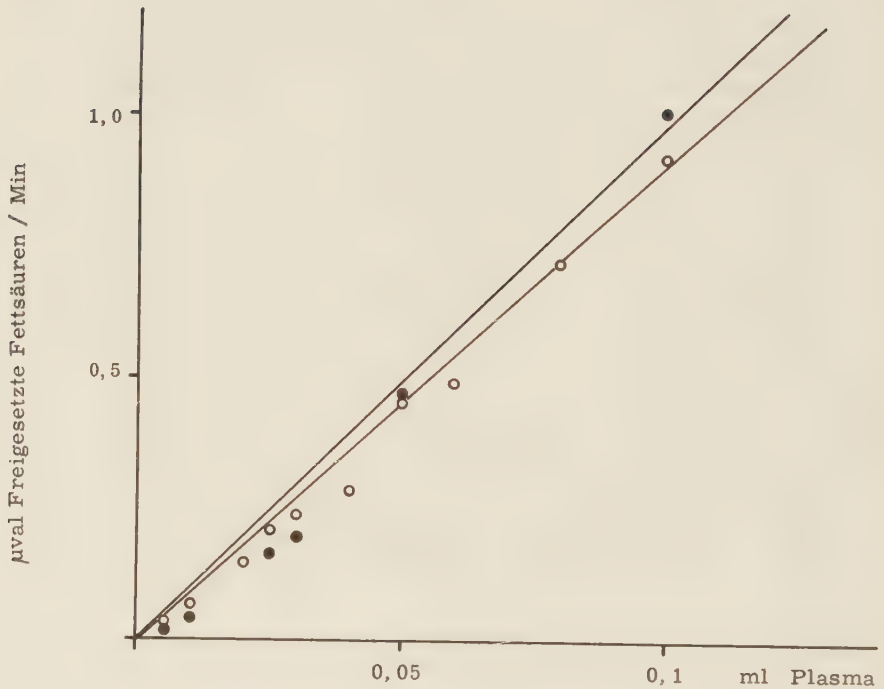


Abb. 8 Korrelationsgerade für die Bestimmungsmethode der Lipoprotein-Lipase im Plasma (Post-Heparin)
● = Substrat: 0,2% Kokosfett in Polyvinylalkohol
○ = Substrat: 6% Kokosfett in Normalplasma

testeten Kinine nur noch zu 25% aktiv.

Nikotin hat in Konzentrationen von $0,6 \times 10^{-6}$ bis 3×10^{-5} Mol/Liter keine lipolytische Wirkung an Rattennebenhoden-Fettgewebsschnitten.

3. Überprüfung der Methodik zur Aktivitätsbestimmung der Lipoprotein-Lipase im Plasma

Emulgierungsversuche mit Kokosfett als Substrat: Die Emulgierungsversuche von Kokosfett mit Wasser, Normalplasma und Polyvinylalkohol ergeben, daß höchste Enzymaktivität der Lipoprotein-Lipase bei 0,2% Kokosfett in 1% Polyvinylalkohol gemessen wird. Ein weiterer Zusatz von Normalplasma bewirkt keine Aktivitätssteigerung. Als optimale Emulgierungszeit werden 3 Min. mit dem Ultra-Turrax ermittelt. Die mit diesem Substrat gefundene Korrelationsgerade, die die Abhängigkeit der Menge freigesetzter Fettsäuren von der Enzymkonzentration darstellt, zeigt einen etwas steileren Verlauf als die Korrelationsgerade, die nach der Methode von SAILER et al. (72) ermittelt wird (Abb. 8). Diese geringe Empfindlichkeitssteigerung wird im unteren Bereich der Nachweisbarkeit der Enzymaktivität, wie sie im Blut gesunder Probanden vorhanden ist, nicht deutlich.

Eigenschaften der Lipoprotein-Lipase: Die mit dem oben geschriebenen modifizierten Substrat getesteten Eigenschaften der Post-Heparin-Lipoprotein-Lipase ergeben ein pH-Optimum von 8,2 (Abb. 9), ein Temperaturoptimum von 35 - 40°C (Abb. 10) und bei Inkubation bis zu 70 Min. gute Proportionalität zwischen freigesetzten Fettsäuren und Inkubationszeit (Abb. 11). Bei der Prüfung der Enzym-Substrat-Bindung fanden sich nach 15 Min. 50% der Enzymaktivität an die Fettphase gebunden. Substrattitrationskurven sind in Abb. 12 dargestellt. Für Kokosfett wird die Substratsättigung am raschesten erreicht; sie liegt bei einer Endkonzentration von 0,2%. Wird isoliertes Fettgewebefett als Substrat angeboten, so liegt die optimale Konzentration über 0,6% Endkonzentration. Bei Verwendung reiner synthetischer Triglycide als Substrat ist die begrenzte Emulgierbarkeit maßgebend für die höchste testbare Substratkonzen-

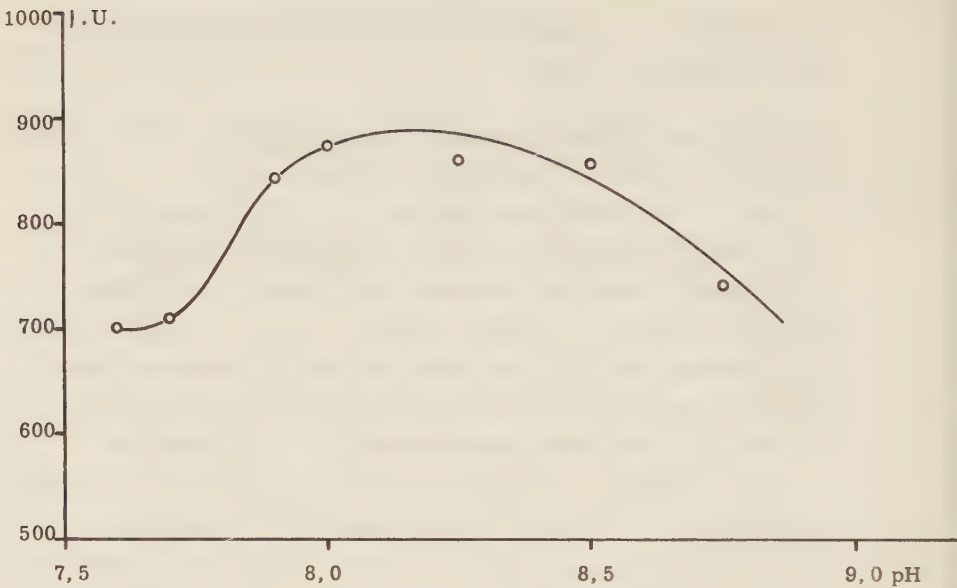


Abb. 9 Abhängigkeit der Lipoprotein-Lipase-Aktivität von der Reaktion des Inkubationsmediums.

tration. Eine direkte Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Kettenlänge der veresterten Fettsäuren des Substrates wird deutlich. Kurzkettige Fettsäuren werden rascher abgespalten als langkettige. Die Substratsättigung liegt umso niedriger, je langkettiger die veresterten Fettsäuren sind. Die Substratspezifität wurde außerdem durch gaschromatographische Analyse von Kokosfett und tierischem Fett (Meerschweinchennebenhodenfett) und der aus ihnen durch die Post-Heparin-Lipoprotein-Lipase freigesetzten Fettsäuren untersucht (Tab. 5). Aus Kokosfett, das hauptsächlich C_{12} - und C_{14} -Fettsäureester enthält, werden auch vorwiegend diese Fettsäuren abgespalten. Entsprechendes gilt für Fettgewebstriglyceride, die vorwiegend aus C_{16} - und C_{18} -Fettsäureestern bestehen; entsprechend

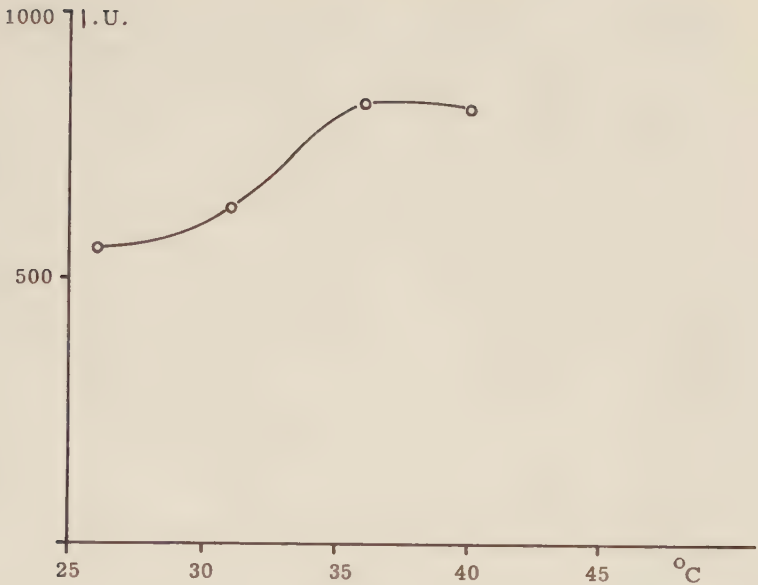


Abb. 10 Abhängigkeit der Lipoprotein-Lipase-Aktivität von der Inkubationstemperatur.

der im Substrat vorhandenen Mengenverteilung der Fettsäureester, werden die Fettsäuren freigesetzt. Lediglich für Linolsäureester-Bindungen scheint eine geringere Affinität zu bestehen. Linolsäure ist im Meerschweinchenfettgewebsfett mit einem Anteil von 21,2% enthalten, wird aber nur mit einem Anteil von 12,9% abgespalten.

Durch Zusatz von Normalplasma zum optimal emulgierten Substrat (0,2% Kokosfett in 1% Polyvinylalkohol) wird die Post-Heparin-Lipoprotein-Lipase nicht aktiviert.

Nikotin in Konzentrationen von 1 bis 6×10^{-3} Mol und cyclisches AMP in Konzentrationen von 1 bis 5×10^{-5} Mol haben keinen Einfluß auf die Post-Heparin-Lipoprotein-Lipase (Tab. 6).

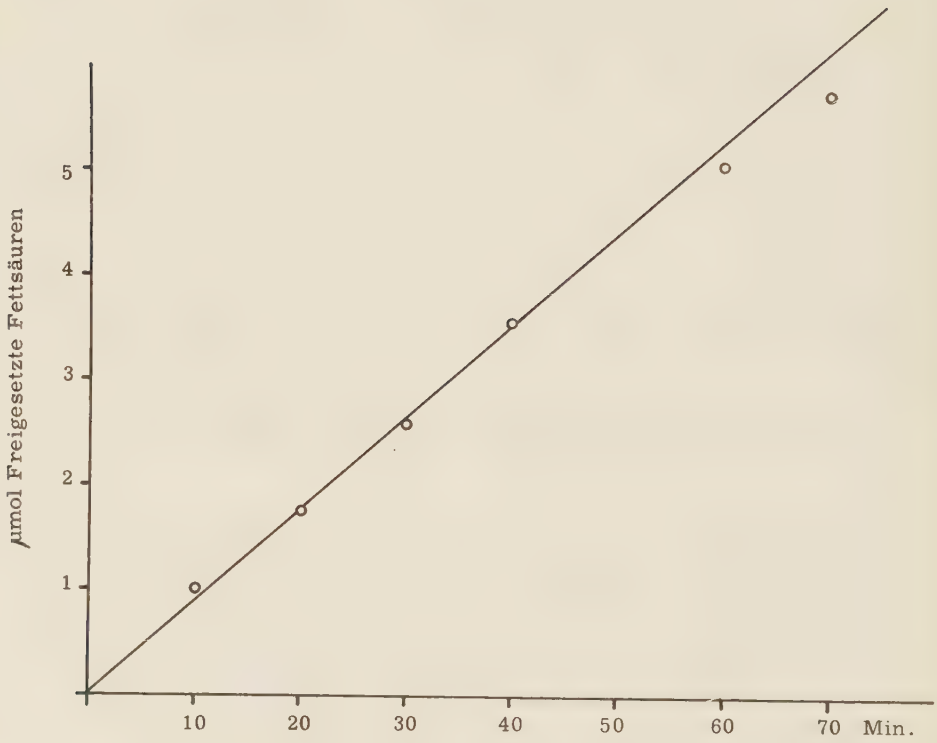


Abb. 11 Abhängigkeit der Lipoprotein-Lipase-Aktivität von der Inkubationszeit.

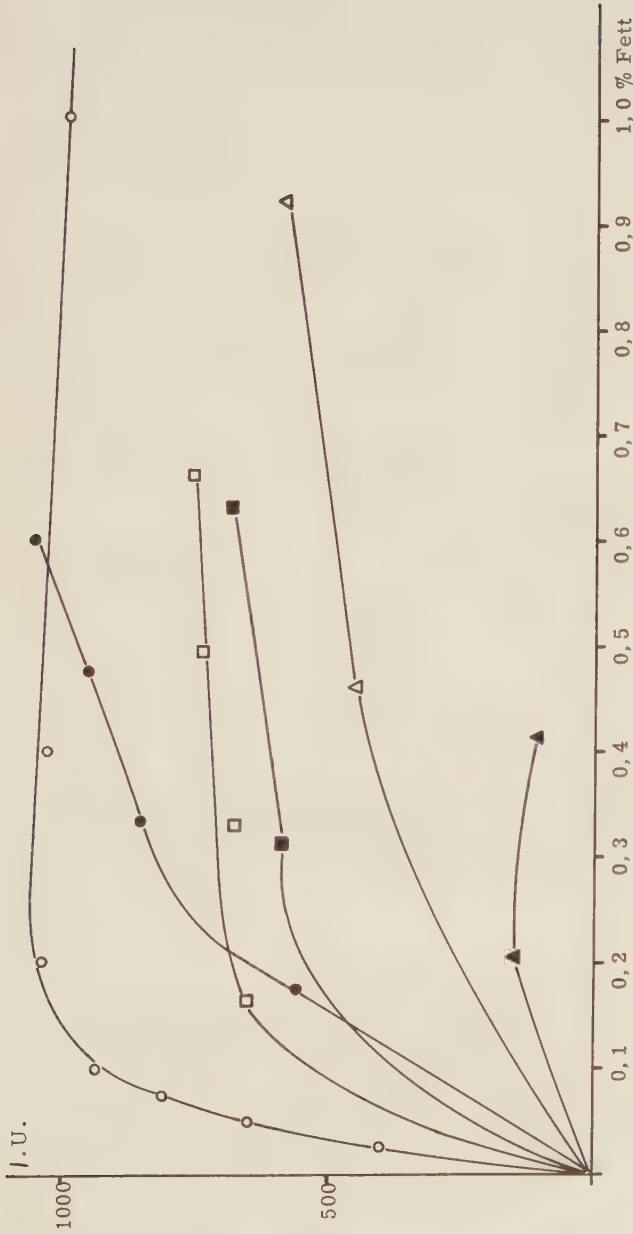


Abb. 12 Substrat-Sättigungskurven der Lipoprotein-Lipase bei Verwendung natürlicher Fettsäure-
estergemische und reiner synthetischer Triglyceride.
(Incubationsbedingungen: 0,1 ml Post-Heparin-Plasma, 0,4 ml 0,9% NaCl, 0,1 ml 0,4 mol Tris-
Puffer, 1,0 ml 8% Albumin, 0,4 ml Substrat, 37°C, 30 Min., pH 8,2)

○ = Kokosfett
● = isoliertes Fettgewebefett (Meerschweinchen-Nebenhoden)
□ = Trilaurin ■ = Trimyristin ▲ = Tristearin

Veresterte Fettsäuren		Freigesetzte Fettsäuren
	%	%
<u>A</u>		
C _{16:0}	31,50	35,50
C _{18:0}	5,71	8,35
C _{18:1}	28,80	29,70
C _{18:2}	21,20	12,90
C _{18:3}	12,60	13,60
<u>B</u>		
bis		
C _{12:0}	63,00	62,60
C _{14:0}	18,00	27,10
C _{16:0}	8,00	8,90
restliche	10,00	1,40

Tab. 5 Gaschromatographische Analysen von Fettsäureester-Gemischen (A = isoliertes Meerschweinchen-Nebenhodengewebsfett, B = Kokosfett) und der aus ihnen durch Inkubation mit Plasma-Lipoprotein-Lipase freigesetzten Fettsäuren.

Desoxycholat bewirkt schon bei einer Konzentration von 3×10^{-2} Mol eine Hemmung der Post-Heparin-Lipoprotein-Lipase (Tab. 6). Während der Aufbewahrung des nicht angereicherten Enzyms bei -15°C tritt in 14 Wochen ein Aktivitätsverlust von 13% auf. Vor und nach Ak-

Substanz	Konzentration Mol/Liter	LPL-Aktivität I. U.	Hemmung %
Desoxycholol	-	928	-
	$3,0 \times 10^{-3}$	673	29
	$7,3 \times 10^{-3}$	615	34
	$1,5 \times 10^{-2}$	636	31
	$3,0 \times 10^{-2}$	527	43
3'-5'-AMP	-	833	-
	1×10^{-5}	805	3
	2×10^{-5}	775	7
	3×10^{-5}	755	10
	4×10^{-5}	755	10
	5×10^{-5}	755	10
Nikotin	-	610	-
	1×10^{-3}	610	0
	2×10^{-3}	620	0
	3×10^{-3}	615	0
	6×10^{-3}	620	0

Tab. 6 Wirkung von Desoxycholol, cyklischem AMP und Nikotin auf die Post-Heparin-Lipoprotein-Lipase im Hundeplasma.

tivierung der Lipoprotein-Lipase im Blut beim Hund durch Heparin in vivo ergibt die gaschromatographische Analyse der FFS im Blut keine wesentliche Veränderung des Fettsäurespektrums. Ein Beispiel ist in Tab. 7 dargestellt. Die Aktivierung der Lipoprotein-Lipase beim Hund durch Heparin in vivo ist 10 bis 14fach.

Fettsäuren	Nüchtern-Plasma %	Post-Heparin-Plasma %
C _{12:0}	0,32	0,93
C _{14:0}	1,63	1,73
C _{16:0}	23,70	25,30
C _{16:1}	6,70	7,95
C _{18:0}	9,85	12,60
C _{18:1}	46,60	42,20
C _{18:2}	11,35	9,50

Tab. 7 Gaschromatographische Analyse der Freien Fettsäuren im Nüchtern-Plasma (Lipoprotein-Lipase : 127 I.U.) und im Post-Heparin-Plasma (Lipoprotein-Lipase : 1793 I.U.) eines Hundes.

E. Diskussion

1. Nikotin und Arteriosklerose

Für eine sinnvolle Diskussion der eigenen Ergebnisse ist die Heranziehung der durch das gesamte Team erarbeiteten Befunde (69, 70, 71) notwendig.

Bezüglich der verabreichten Nikotin-Dosis im Langzeitversuch an Kaninchen scheinen zwei Dinge von besonderer Bedeutung: a) Die verabreichte Nikotindosis verursacht keine allgemeintoxische Schädigung; denn die bei Versuchsbeginn jungen Tiere entwickeln sich normal. Ihre Gewichtszunahme im Verlauf des Lebens verläuft wie die der Kontrolltiere. Auch bei Erhebung des Blutstatus nach 20 Monaten (Hämoglobin, Erythrocyten, Leukozyten mit Differentialblutbild, Serumelektrolyte, Harnstoff, Blutzucker, Gesamteiweiß mit elektrophoretischer Bestimmung der Eiweißfraktionen, Amylase, saure und alkalische Phosphatase, Cholinesterase, Laktatdehydrogenase, Leucinaminopeptidase, Sorbitdehydrogenase, Alanin- und Aspartat-Transaminase) und bei der Autopsie findet sich kein Hinweis auf eine toxische Schädigung der Organsysteme. b) Die Resorption des oral verabreichten Nikotins ist nahezu vollständig. Beim Vergleich mit der beim Inhalieren von Zigarettenrauch resorbierten Nikotinmenge entspricht sie einer Zahl von etwa 100 Zigaretten täglich beim Menschen. Unter diesen Gesichtspunkten erscheint die gewählte Nikotindosis nahezu ideal, da sie über der beim starken Raucher zu erwartenden Dosis liegt und ohne klinisch in Erscheinung tretende Zeichen einer Intoxikation toleriert wird.

Aus der Analyse der Blutlipide im Verlauf des Lebens der Versuchstiere ergibt sich kein deutlicher Hinweis für eine Veränderung des Fettstoffwechsels durch Nikotin. Dieses Ergebnis ist zusammen mit den weitgehend unauffälligen Befunden der Lipidanalysen von Aorta, Herz

und Leber in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von GUDBJARNA-SON (86) an Hunden. Lediglich in Bezug auf das Lebensalter besteht für alle Lipidfraktionen außer den FFS ein statistisch signifikanter Unterschied, nicht aber in Bezug auf die Nikotinaufnahme. Die Konzentration der FFS im Blut scheint nach 8 und 12 Monaten bei den Versuchstieren deutlich höher zu liegen als bei den Kontrolltieren. Wegen der großen Streubreite der Werte ist dieses Verhalten jedoch nicht statistisch signifikant. Die große Streubreite der Werte für den FFS-Spiegel im Blut ist erklärbar mit der Tatsache, daß schon geringste Belastungen wie Aufrichten aus der Ruhelage und leichte psychische Stresssituationen wie der Einstich einer Blutentnahme-Kanüle zu einem meßbaren Anstieg der FFS im Blut führen können (87). Darüber hinaus spiegelt der FFS-Gehalt des Blutes nicht im vollen Maße die stattgehabte Lipolyse wider, da einerseits die Halbwertszeit für die FFS nur 2 - 3 Minuten beträgt (88), andererseits zwei Drittel der liberierten Fettsäuren am Ort der Lipolyse, in der Fettzelle, wiederverestert werden (89). CARLSON und ÖRÖ (90) sehen daher in der Messung des Glycerins im Blut einen geeigneteren Indikator der Lipolyse. Das bei der Lipolyse freigewordene Glycerin erscheint vollständig im Blut, da es nur in der Leber weiterverarbeitet werden kann.

Trotz fehlender statistischer Signifikanz scheint der Befund der erhöhten FFS im Blut der Nikotingruppe in Zusammenhang mit der erhöhten Lipoprotein-Lipase-Aktivität des Aorten- und Herzgewebes auf eine durch Nikotin stimulierbare Lipolyse hinzuweisen. Auch der erhöhte Gehalt der FFS in diesen Organen und in der Leber bei erniedrigtem Neutralfettgehalt der Leber deuten in diese Richtung. Leider konnte die Lipoprotein-Lipase-Aktivität des Plasmas, die nach KORN (91) aus dem Fettgewebe und dem Herzen stammt, nicht gemessen werden. Dafür gibt es bisher keine ausreichend empfindliche Methode. Auch die in dieser Arbeit unternommenen Versuche einer Empfindlichkeitssteigerung durch Modi-

fizierung des Substrates waren erfolglos. Auf eine Stimulierung des Enzyms durch Heparin in vivo haben wir bewußt verzichtet, um nicht andere zu messende Faktoren dadurch zu verändern.

Der Mechanismus der Lipolysestimulierung durch Nikotin über die Katecholamine gilt als gesichert (12, 19, 20, 21). Hinsichtlich der gewählten Tierspecies Kaninchen muß aber diskutiert werden, ob dieser Mechanismus beim Kaninchen auch angenommen werden kann. Nach den vergleichenden endokrinologischen Untersuchungen von RUDMAN et al. (92) gibt es eine speciesabhängige Empfindlichkeit des lipolytischen Systems gegenüber den verschiedenen lipolytischen Hormonen. Diese Autoren finden in vitro beim Kaninchen, Meerschweinchen und Hausschwein keine Stimulierung der Lipolyse des Fettgewebes durch Adrenalin und Noradrenalin. Ob Nikotin selbst auf einem direkten Wege eine Aktivierung der Lipolyse beim Kaninchen bewirkt, muß offen bleiben. Für Mensch, Hund und Ratte muß sie nach den bisherigen Untersuchungen verneint werden (17, 18). WHITE (53) fand sogar eine Hemmung des lipolytischen Systems durch Nikotin in vivo und in vitro bei der Ratte. Wir selbst konnten in der vorliegenden Arbeit in vitro weder einen Einfluß des Nikotins auf die Serum-Post-Heparin-Lipoprotein-Lipase des Hundes noch eine lipolytische Wirkung des Nikotins am Rattennebenhoden-Fettgewebe nachweisen. Beachtenswert ist, daß CUNNINGHAM und FRIEND (93) durch Verabreichung von Nikotin an Hausschweine die Mästung von proteinreichem und fettarmem Fleisch erzielten, obwohl die Lipolyse dieser Tiere - wie oben erwähnt - nach RUDMAN (92) durch Katecholamine in vitro nicht stimulierbar ist. - Sicher kann man von den in vitro erhobenen Befunden nicht vorbehaltlos auf den physiologischen Regelmechanismus schließen.

Aus den pathologisch-histologischen Untersuchungen ergab sich kein Anhalt dafür, daß die Nikotin-Tiere in stärkerem Maße Gefäßwandver-

änderungen im Sinne der Arteriosklerose entwickelt hätten als die Kontrolltiere. Insbesondere fand sich kein morphologisches Korrelat für die gesteigerte lipolytische Aktivität in Herz und Aorta sowie für den stark erhöhten Calcium-Gehalt der Aorta. Daß diese Diskrepanz keineswegs gegen eine beginnende Sklerosierung der Gefäßwand spricht, muß man nach dem Übersichtsreferat von PLATT (94) über Gefäßwandstoffwechsel und Arteriosklerose annehmen. PLATT zitiert darin eine Reihe von Autoren, die vor dem Auftreten morphologisch sichtbarer Umbauvorgänge der Gefäßwand biochemisch faßbare Veränderungen des Gefäßwandstoffwechsels beobachteten. Besonders die Untersuchungen von ZEMPLÉNYI (95) zur experimentellen Arteriosklerose sprechen dafür, daß es sich bei unseren Beobachtungen um eine der Arteriosklerose vorausgehende Gefäßwandstoffwechselstörung handeln könnte. Dieser Autor fand nämlich bei sechs Monate lang cholesterin-reich ernährten Kaninchen eine gesteigerte Lipoprotein-Lipase-Aktivität im Aortengewebe. Die pathophysiologische Bedeutung der Lipoprotein-Lipase bei der Arteriosklerose könnte in der Bereitstellung von Fettsäuren für eine gesteigerte Lipidsynthese liegen, wie sie beispielsweise PARKER et al. (96) in arteriosklerotischen Gefäßen für Phospholipide nachweisen konnten.

Eine andere Interpretation des Befundes der gesteigerten Lipoprotein-Lipase-Aktivität in Herz und Aorta bietet sich an, wenn die pharmakologische Wirkung des Nikotins auf das Herz in die Diskussion mit einbezogen wird. Nikotin steigert die Herzfrequenz, erhöht das Herzminutenvolumen (bei Gesunden bis zu 27 %) und erweitert die Koronarien. Der sich daraus ergebende erhöhte Energiebedarf des Myokards ist objektivierbar durch Messung einer erhöhten O_2 -Utilisation (21). Da der Herzmuskel bis zu 80 % seines Energiebedarfs durch die Metabolisierung von FFS deckt (97), könnte die Steigerung der Lipoprotein-Lipase-Akti-

vität als eine physiologische Adaptation an einen erhöhten Energiebedarf unter Nikotin aufzufassen sein. Einen entsprechenden Anpassungsvorgang fand HOLLENBERG (98) bei Ratten, bei denen durch Fasten die Lipoprotein-Lipase-Aktivität im Herzmuskel auf das Dreifache anstieg. Der erhöhte FFS-Gehalt in Herz, Aorta und Plasma und der stark erniedrigte Neutralfettgehalt der Leber bei sonst normalen Blut- und Gewebslipiden stützen die Hypothese in gleicher Weise wie das Fehlen pathologisch-anatomischer Veränderungen an den Gefäßen der Nikotin-Tiere.

2. Wirkung der Kinine auf die Lipolyse

Der in orientierenden Versuchen nach i.v. Verabreichung von 0,5 KE Kallikrein beobachtete Anstieg der FFS im Blut kann als Aktivierung der Lipolyse gedeutet werden, auch wenn der Grad der Aktivierung nur gering ist. Eine Dosisabhängigkeit ist bei Injektion höherer Dosen (protahiert bis 5 KE) nachzuweisen; allerdings erreicht der FFS-Spiegel im Blut in keinem Fall Werte oberhalb der Norm. Aus dem weiteren Anstieg der FFS im Blut durch die nachfolgende Nikotin-Injektion kann man erkennen, daß das lipolytische System intakt war und daß die Kinine die Lipolyse vermutlich über den gleichen Mechanismus wie das Nikotin (12, 19, 20, 21), nämlich über die Katecholamine, stimulieren. Auch der fehlende oder nur verzögerte Anstieg der FFS beim Reserpin-behandelten Hund spricht für einen identischen Wirkungsmechanismus von Kininen und Nikotin. Die Kinine haben keine direkte lipolytische Wirkung, wie die in-vitro-Versuche an Rattennebenhoden-Fettgewebe und an isolierten Fettzellen zeigen.

Die intraaortale Injektion von Kallidin und Nikotin führt zu keinem Anstieg der FFS im Blut. Dieses ist insofern ein unerwartetes Ergebnis, als die erhebliche, kurzfristige, dosisabhängige Blutdrucksteigerung sowohl nach Kallidin als auch nach Nikotin auf eine Freisetzung großer

Mengen Katecholamine aus der Nebenniere hinweist (60, 99). Ob diese Katecholamine nicht lipolytisch wirksam werden, weil sie gleichzeitig aufgrund ihrer vasokonstriktiven Wirkung zu Zirkulationsstörungen führen, kann nicht geklärt werden. Denkbar wäre auch eine gleichzeitige extreme Corticosteroid-Ausschüttung der Nebennierenrinde mit konsekutiver Hyperglykämie, die eine Hemmung der Lipolyse verursacht. Dieses Problem muß offen bleiben, weil wir in unseren Versuchen keine gleichzeitigen Blutzuckerbestimmungen durchführten. Eine direkte Hemmung der lipolytischen Enzyme durch Kinine kann nach den Untersuchungen über den Einfluß der Kinine auf die durch Noradrenalin stimulierbare Lipolyse an Rattennebenhoden-Fettgewebsschnitten und isolierten Fettzellen ausgeschlossen werden.

Schließlich muß berücksichtigt werden, daß die oben diskutierten Hunderversuche in Pentobarbital-Narkose durchgeführt wurden. Dieses ist zwar die übliche Methode zur Testung lipolytisch wirksamer Substanzen in vivo (23), sie erschwert aber in diesem speziellen Fall die Deutung der Ergebnisse. Wir beobachteten nämlich unter alleiniger Barbiturat-Wirkung einen signifikanten Abfall der FFS im Blut. Diese Befunde sind in Übereinstimmung mit Angaben in der Literatur, nach denen Reserpin (100) und andere central dämpfende Pharmaka wie Chlorpromazin, Meprobamat, Barbiturat (101, 102) und Thiopentan (103) eine hemmende Wirkung auf die durch Katecholamine aktivierte Lipolyse haben.

So kann man aus den vorliegenden Ergebnissen schließen, daß der von COLLIER (67) postulierte Regelmechanismus zwischen dem Katecholamin- und Kininsystem an einer Aktivierung der Lipolyse erkennbar ist. Da aber der Grad der Lipolyse-Aktivierung unter den gewählten Versuchsbedingungen durch Kallikrein nur gering ist und durch Kallidin bei maximaler Stimulierung der Nebenniere durch intraadrenale Applikation überhaupt nicht nachweisbar ist, ist die pathophysiologische Be-

deutung der lipolytischen Wirkung der Kinine zweifelhaft.

3. Lipoprotein-Lipase-Aktivität im Plasma

Die Lipoprotein-Lipase des Plasmas ist nach dem heutigen Stand der Forschung identisch mit der Lipoprotein-Lipase des Gewebes (32), die die Triglyceridaufnahme in das Gewebe reguliert. Sichere Beweise der Identität gibt es nicht, da das Enzym wegen seiner Instabilität bisher nicht isoliert werden konnte. Wegen der niedrigen endogenen Lipoprotein-Lipase-Aktivität im Plasma, die durch Bindung des Enzyms an die Zelloberfläche im Gewebe gedeutet wird (104), gibt es bis heute keine befriedigende Bestimmungsmethode im Blut. Mit der manometrischen (105) und der nephelometrischen Methode (106) werden etwa gleichgroße Enzymaktivitäten gemessen (107). Diese beiden Methoden sind außerordentlich störanfällig, so daß der titrimetrischen Methode (108) der Vorzug gegeben wird.

SANDHOFER, SAILER und BRAUNSTEINER (104) fanden damit beim Menschen Mittelwerte von 1,41 I.U. nüchtern und 3,37 I.U. 2 Stunden nach einer Mahlzeit (Mittlere Streuung $S = 1,24$ bzw. $1,56$). Um in einen besseren Meßbereich zu kommen, der die Stoffwechselregulation im Fettgewebe erkennbar im Blut widerspiegelt, bedient man sich allgemein der Stimulierung der endogenen Enzymaktivität durch Heparin (109, 110), die erstmals von KORN (111) beschrieben wurde. Die im folgenden diskutierten Versuche wurden mit Plasma-Post-Heparin-Lipoprotein-Lipase des Hundes durchgeführt.

Geleitet von der Vorstellung, daß vor allem der Grad der Emulgierung bzw. die Größe der Fettpartikel des Substrates entscheidend sind für die Enzymaktivität gegenüber dem Triglyceridsubstrat, wie von BENZONANA und DESNUELLE (73) für die Pankreas-Lipase nachgewiesen wurde, fanden wir als geeigneten Emulgator für Kokosfett Polyvinylalkohol. Wäh-

rend bei in Normalplasma emulgiertem Kokosfett Substratsättigung erst bei 6% Kokosfett erreicht wird (108), finden wir für Kokosfett, das in 1% Polyvinylalkohol emugliert wurde, schon bei 0,2% Kokosfett Substratsättigung. Die fehlende Aktivierung durch Normalplasmazusatz zu diesem Substrat spricht dafür, daß es sich bei der von einigen Autoren (108) empirisch gefundenen "Aktivierung" der Lipoproteinlipase durch Normalplasmas eigentlich um eine Verbesserung der Emulgierung durch die Eiweißlösung handelt. Sie dürfte dem von BIERMANN (112) beschriebenen Proteinkontakt der Chylomikronen entsprechen. BOBERG und CARLSON (113) fanden bei der Testung käuflicher Fett-Infusionslösungen als Substrat der Lipoprotein-Lipase, daß eine Emulsion aus Sojabohnenöl, nativen Eiphsphatiden und Glycerin (Intralipid^R) den Chylomikronen entspricht. Unsere Ergebnisse zeigen, daß bei geeigneter Emulgierung auf einen Zusatz von Normalplasma verzichtet werden kann, denn mit beiden Kokosfett-Substraten werden übereinstimmende Enzymaktivitäten gemessen.

Die Eigenschaften der Post-Heparin-Lipoprotein-Lipase des Hundes stimmen in Bezug auf pH-Optimum, Hemmung durch Desoxycholat und Enzymkinetik gut mit der Literatur überein (108). Mit dem in Polyvinylalkohol hergestellten Kokosfettsubstrat konnte eine Enzym-Substrat-Bindung, wie sie von ROBINSON et al. (114, 115) angegeben wurde, durch Ultrazentrifugation nachgewiesen werden. Der fehlende Einfluß von Nikotin und 3'-5'-AMP auf die Enzymaktivität sind bisher nicht beschrieben. Letzteres mag als neuerliche Bestätigung für das Fehlen einer hormonempfindlichen lipolytischen Aktivität im Blut gelten (116). Bezüglich der Substratspezifität der Lipoprotein-Lipase ist hervorzuheben, daß isoliertes Fettgewebefett weniger rasch gespalten wird als Kokosfett bei Verwendung des gleichen Emulgierungsverfahrens. Dieses kann auf den größeren Anteil langkettiger Fettsäuren im Fettgewebefett zurückgeführt werden, nicht im Sinne einer Spezifität gegenüber Esterbindungen bestimmter Fettsäuren - diese konnten wir bei der Testung natürlicher Tri-

glyceridgemische nur für Linolsäure nachweisen - sondern aufgrund der schlechteren Emulgierbarkeit langkettiger Triglyceridester. Diese Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Kettenlänge der veresterten Fettsäuren und von der Emulgierbarkeit wurde bei der Testung reiner synthetischer Triglyceride besonders deutlich.

Der Befund der verminderten Enzymaktivität gegenüber Linolsäure-triglyceridbindungen ist nicht erklärbar und bedarf einer Überprüfung. Der Befund steht im Gegensatz zu Untersuchungen von ENGELBERG (117), der in hochungesättigten Fettsäuren ein bevorzugtes Substrat der Lipoprotein-Lipase fand.

F. Zusammenfassung

1. Kaninchen erhielten 20 Monate lang täglich 1,14 mg Nikotin pro kg Körpergewicht. Bei fast vollständiger Resorption wurde diese Dosis ohne Intoxikationserscheinungen toleriert.

Als Teil einer Studie wurden im Laufe des Lebens die Blutlipide bestimmt. Gesamtlipide, verestertes Cholesterin, Phosphatide und veresterte Fettsäuren stiegen nach 12 Monaten an und fielen nach 20 Monaten auf den Ausgangswert ab. Unterschiede zwischen der Nikotin- und Kontrollgruppe ergaben sich nicht.

Die Mittelwerte der FFS im Blut waren bei der Nikotingrouppe nach 8 Monaten um das Doppelte, nach 12 Monaten um ein Drittel erhöht und nach 20 Monaten genauso hoch wie bei der Kontrollgruppe. Dieser Unterschied ist statistisch nicht signifikant. Die Befunde werden hinsichtlich ihrer pathogenetischen Bedeutung für die Arteriosklerose diskutiert.

2. In orientierenden Versuchen verursachte i.v. verabreichtes Kallikrein eine Erhöhung der FFS im Blut bei Hunden in Barbiturat-Narkose. Diese Wirkung war dosisabhängig, mit Nikotin vergleichbar und durch Vorbehandlung mit Reserpin unterdrückbar. Intraaortal verabreichtes Kallidin hingegen hatte keinen Einfluß auf die FFS im Blut.

Bei Hunden verursachte die Barbiturat-Narkose einen signifikanten Abfall der FFS im Blut.

In vitro hatten Kallidin, Bradykinin und Nikotin keine lipolytische Wirkung am Fettgewebe oder an isolierten Fettzellen und keinen Einfluß auf die durch Noradrenalin stimulierbare Lipolyse. Die Frage einer pathophysiologischen Bedeutung der lipolytischen Wirkung der Kinine via Katecholamine wird diskutiert.

3. Eine Überprüfung der Methodik der Aktivitätsbestimmung der Lipoprotein-Lipase im Plasma führte zur Modifizierung des Substrates. Höchste Spezifität bestand gegenüber Kokosfett, in 1% Polyvinylalkohol emulgiert; Substratsättigung lag bei 0,2%; eine Enzym-Substrat-Bindung konnte nachgewiesen werden. Normal-Plasma-Zusatz bewirkte keine weitere Aktivierung. Die Eigenschaften der Post-Heparin-Lipoprotein-Lipase des Hundes wurden mit diesem Substrat untersucht: pH-Optimum 8,2; Temperatur-Optimum 35 - 40°C; kein Einfluß auf die Enzymaktivität durch Nikotin und 3', 5'-AMP; Hemmung durch Desoxycholat. Bei der Untersuchung der Substratspezifität der Lipoprotein-Lipase wurde eine Abhängigkeit von der Kettenlänge der Fettsäureester gefunden.

Der Zusammenhang von Substratspezifität und Emulgierungsgrad des Substrates wird diskutiert.

G. Literaturverzeichnis

- 1) Smoking and Health Report of the Advisory Committee of the Surgeon General of the Public Health Service. Public Health Service Publication No 1103, Washington DC (Terry Report) (1964).
- 2) DOYLE, J.T., T.R. J. Amer. Med. Ass. 190, 886 (1964)
DAWLER, W.B. KANNEL,
S.H. KINCH, und H.A.
KAHN
- 3) DAWBER, T.R. und W.B. Circulation 34, 553 (1966)
KANNEL
- 4) GSELL, O. in: H.Schievelbein, Nikotin, Pharmakologie und Toxikologie des Tabakrauches, Thieme Stuttgart (1968)
- 5) SCHETTLER, G. Vortrag Österr. Ärztekongress, van Swieten-Tagung Wien 1968
- 6) ZOLLINGER, H.U. Pathologische Anatomie Bd. II, Thieme Stuttgart (1968)
- 7) WERLE, E. und H. Nature 107, 871 (1965)
SCHIEVELBEIN
- 8) SINGH, J. und Fed. Proc 20, 168 (1961)
Y.T. OESTER
- 9) WENZEL, D.G. und J. J. Pharm. Sci. 51, 875 (1962)
SINGH
- 10) SHIMAMOTO, T. ASIAN MED.J. 3, 479 (1960)
- 11) HESS, H. und H. FROST Fortschr. Med. 86, 841 (1968)
- 12) LARSON, P.S., H.B. Tobacco: Experimental and clin. studies, Williams and Wilkins, Baltimore (1961)
HAAG und S.SILVETTE
- 13) KERSHBAUM, A., S. Circulation Research 9, 631 (1961)
BELLET, E.R.DICKSTEIN
and L.J. FEINBERG
- 14) KERSHBAUM, A., R. Circulation Vol XXVIII, 52 (1963)
KHORSANDIAN, R.F.
CAPLAN, S. BELLET and
L.J. FEINBERG

- 15) KERSHBAUM, A., S. J. Amer.Med.Ass. 195, 1095 (1966)
BELLET and
J. JIMINEZ
- 16) MILTON, A.S. Brit. J. Pharmacol. 26, 256 (1966)
- 17) VERDY, M. Rev.can.Biol. 26, 179 (1967)
- 18) KERSHBAUM, A., Specialia 128 (1969)
H. OSADA, D.J.
PAPPAJOHN and S.
BELLET
- 19) KERSHBAUM, A., J. J. Atheroscler. Res. 6, 524 (1966)
JIMINEZ, S. BELLET
und D. ZANUTTINI
- 20) HANSSON, E. und C.G. J.Pharm.exp.Therap. 137, 1 (1962)
SCHMITTERLÖW
- 21) SCHIEVELBEIN, H. in: H. Schievelbein, Nikotin, Pharma-
kologie und Toxikologie des Tabakrau-
ches, Thieme Stuttgart (1968)
- 22) McKAY, E.M. Amer. J.Physiol. 120, 361 (1937)
- 23) CARLSON, L.A., J. in: Handbook of Physiology, Section 5,
BOBERG und B.HÖG-
STEDT Adipose Tissue, hrsg. A.E. Renold
und G.F.Cahill, Amer.Physiol.Soc.
(1965)
- 24) CARLSON, L.A. und Acta med.scand. 173, 25 (1963a)
S.O. LILJEDÄHL
- 25) CARLSON, L.A. und Acta med. scand. 173, 719 (1963b)
S.O. LILJEDÄHL
- 26) FRANKSSON, C., C.A. J.clin.Endocr. 14, 608 (1954)
GEMZELL und U.S.
v. EULER
- 27) WADSTRÖM, L.B. Acta clin.scand 1961, Suppl. 282
- 28) BIRKE, G., L.A.CARLSON Acta med.scand. 1965
und S.O. LILJEDÄHL
- 29) REIMANN, R. und P. Dtsch. med. Wschr. 96, 93 (1971)
SCHWANDT
- 30) JEWITT, D.E., C.J. Lancet 1969 / I, 635
MERCKER, D. REID,
C.VALORI, M.THOMAS
und J.P.SHILLINGFORD

- 31) WESTERMANN, E. Fette in der Med. 7, 8 (1965)
- 32) SCHLIERF, G. und W. Fettstoffwechsel in: Klinische Patho-
KAHLKE physiologie, hrsg. W.Siegenthaler
Thieme Stuttgart 1970
- 33) RAAB zit. nach G.SCHETTLER, Arterio-
sklerose, Thieme Stuttgart 1961
- 34) JOSUE, M.O. C.R.Soc.Biol. (Paris) 55, 1374 (1903)
- 35) MEHNERT, H. und in: Stoffwechselkrankheiten, Thieme
H. FÖRSTER (1970)
- 36) GOFMAN, J.W., F.T. Geriatrics Minneapolis 10, 349 (1955)
LINDGREN, B.STRISOWER,
O.F. DELALLA, F.GLAZIER
und A. TEMPLIN
- 37) KARVONEN, M. E. ORMA, Lancet 1959 / I, 492
A. KEYS, F. FIDANZA und
J. BROZEK
- 38) BRONTE-STEWART, B. Brit. Med. J. 1961 / I, 379
- 39) THOMAS, C.B. J.chron.Dis. 7, 198 (1958)
- 40) KANNEL, W.B., L.K. Schweiz.med.Wschr. 95, 18 (1965)
WIDMER und T.R.
DAWBER
- 41) EPSTEIN, F.H. in: Pathophysiologische und klin.
Aspekte des Fettstoffwechsels, hrsg.
G. Schettler und R. Sanwald, Thieme
Stuttgart 1966
- 42) HEYDEN, S. in: Pathophysiologische und klin. As-
pekte des Fettstoffwechsels, hrsg.
G. Schettler und R. Sanwald, Thieme
Stuttgart 1966
- 43) BUTKUS, A. und J.H. J.Amer.Med.Ass. 195, 138 (1965)
PAGE
- 44) CZOCHRA-LYSANOWICZ, Ann.Univ.Mariae Curie-Sklodowska
A., M. GORSKI und (Med.) 14, 181 (1959)
M. KEDRA
- 45) GROSGOGAT, Y.G., J. Atheroscler. Res. 5, 291 (1965)
G.ANGUERA, J.LELLOUCH,
B.JACOTOT und J.-L.
BEAUMONT

- 46) WENZEL, D.G. und G.L. J.Amer. Pharm.Ass. 57, 338 (1958)
BECKLOFF
- 47) WENZEL, D.G., J.A. J. Amer. Pharm.Ass. 58, 115 (1959)
TURNER und D.KISSIL
- 48) WENZEL, D.G., J.A. Ann. N.Y. Acad.Sci. 90, 302 (1960)
TURNER und J.S.KAMAL
- 49) CRAMÉR, K., S.PAULIN Circulation 33, 888 (1966)
und L. WERKÖ
- 50) KONTTINEN, A. und Brit. Med. J. 1963 / I, 850
M. RAJASALMI
- 51) ENGELBERG, H. Circulation 34, Supp. 3, 10 (1966)
- 52) BECKER, G.H. und Gastroenterology 14, 80 (1950)
H. NECHELES
- 53) WHITE, H.J., I. GORE Biochim. biol. speriment. 3, 107 (1964)
und B.I. LARKEY
- 54) ANGERVALL, G. und Acta med. Scand. 157, 407 (1957)
B. GOOD
- 55) ANTONINI, F.M. und L. Bull. Schweiz. Acad. Med. Wiss.
SALVINI 13, 209 (1957)
- 56) HASS, G.M., W. LANDER- Circulation 34, 739 (1966)
HOLM und A. HEMMENS
- 57) GROSGOGEAT, Y.G. und Pathol. Biol. 13, 1140 (1965)
G. ROUBELAKIS
- 58) MIRSKY, A. in: Handbook of Physiology, Section 5,
Adipose Tissue, hrsg. A.E. Renold
und G.F. Cahill, Amer.Physiol.Soc.
(1965)
- 59) FREY, E.K., H.KRAUT Das Kallikrein-Kinin-System und seine
und E. WERLE Inhibitoren, Ferdinand Enke Verlag
Stuttgart 1968
- 60) FELDBERG, W., und G. J. Physiol. 171, 98 (1964)
P. LEWIS
- 61) FELDBERG, W. und G. J. Physiol. 178, 239 (1965)
P. LEWIS
- 62) LEWIS, G.P. und R.REIT J. Physiol. 176, 28 P (1964)
- 63) LEWIS, G.P. und R.REIT J. Physiol. 179, 538 (1965)

- 83) DOSS, M. und K. OETTE Z. klin. Chem. 3, 125 (1965)
- 84) FOLCH, J., M. LEES und G.H. SLOANE STANLEY J. Biol. Chem. 226, 497 (1957)
- 85) RODBELL, M. J. Biol. Chem. 239, 375 (1964)
- 86) GUDBJARNASON, S. J. Pharmacol. Exper. Therap., Baltimore 161, 47 (1968)
- 87) BOGDONOFF, M.D. und C.R. NICHOLS in: Handbook of Physiology, Section 5, Adipose Tissue; hrsg. A.E. RENOLD und G.F. CAHILL jr., Amer. Physiol. Soc. (1965)
- 88) ISSEKUTZ, B., W.M. BORTZ, H.J. MILLER und P. PAUL Metabolism 16, 1001 (1967)
- 89) RODBELL, M. und A.B. JONES J. Biol. Chem. 241, 140 (1966)
- 90) CARLSON, L.A. und L. ÖRÖ Metabolism 12, 12 (1963)
- 91) KORN, E.D. und T.W. CHIGLEY Biochim. Biophys. Acta 18, 143 (1955)
- 92) RUDMAN, D.M. DiGIRO- in: Handbook of Physiology, Section 5, LAMO, M.F. MALKIN und Adipose Tissue; hrsg. A.E. RENOLD L.A. GARCIA und G.F. CAHILL jr., Amer. Physiol. Soc. (1965)
- 93) CUNNINGHAM, H.M. und D.W. FRIEND J. Animal Sci. 24, 41 (1965)
- 94) PLATT, D. Med. Klinik 64, 1261 (1969)
- 95) ZEMPLÉNYI, T., Z. LOJDA und O. MRHOVA in: Atherosclerosis and its origin; hrsg. SANDLER und BOURNE, Academic Press, New York-London (1963)
- 96) PARKER, F., J.W. ORMSBY, N.F. PETERSON, G.F. ODLAND und R.H. WILLIAMS Circulation Res. 19, 700 (1966)
- 97) BING, R.J. Verh. Dtsch. Ges. f. Kreislaufforschung, S. 143 (1961). Dietrich Steinkopf-Verlag, Darmstadt.

- 98) HOLLENBERG, C.H. in: Handbook of Physiology, Section 5, Adipose Tissue; hrsg. A.E. RENOLD und G.F. CAHILL jr., Amer.Physiol. Soc (1965)
- 99) BAGWELI, E.E.,
E.F. WOODS und
J.A. RICHARDSON Proc.Soc.Expl. Biol. Med. 103, 467 (1960)
- 100) PAOLETTI, R., R.P.
MAICKEL, R.L.SMITH
und B.B. BRODIE in: Effects of drugs on synthesis of mobilization of lipids, Vol. 2, S. 29 (Proceedings of the 1st International Pharmacol. Meeting) (1963)
- 101) KHAN, A.U., R.B.
FORNEY und F. W.
HUGHES Arch. int. Pharmacodyn. 151, 459 (1964)
- 102) KHAN, A.U., R.B.
FORNEY und F.W.
HUGHES Arch. int. Pharmacodyn. 151, 466 (1964)
- 103) KOHOUT, M., J.
FODOR und T.BRAUN Biochem. Pharmacol. 1963, 2. Intern. Pharmacol. Meeting, Prag
- 104) CHERKES, A. und
R.S. GORDON J. Lipid Res. 1, 97 (1959)
- 105) SAILER, S., F. SAND-
HOFER und H. BRAUN-
STEINER Klin. Wschr. 39, 585 (1961)
- 106) KATZ, S. J.appl.Physiol. 10, 519 (1957)
- 107) SCHÄR, J. Psychiat. Neurol. Basel 150, 92 (1965)
- 108) SANDHOFER, F., S.
SAILER und H. BRAUN-
STEINER Dtsch. med. Wschr. 89, 426 (1964)
- 109) WHAYNE, T.F. Jr. und J.M. FELTES Circulation Res. XXVI, 545 (1970)
- 110) BOLZANO, K., S.
SAILER, F. SANDHOFER
und H.BRAUNSTEINER Klin. Wschr. 46, 472 (1971)
- 111) KORN, E.D. J.biol. Chem. 215, 1 (1955)
- 112) BIERMANN, E.L. in: Handbook of Physiology, Section 5, Adipose Tissue; hrsg. A.E. RENOLD und G.F. CAHILL jr., Amer.Physiol. Soc. (1965)

- 113) BOBERG, J. und L.A. Clin.Chim.Acta 10, 420 (1964)
CARLSON
- 114) ROBINSON, D.S., G.H. Quart. J. exp. Physiol. 39, 165 (1954)
JEFFRIES und J.C.F.
POOLE
- 115) ROBINSON, D.S., G.H. Quart. J. exp. Physiol. 40, 297 (1955)
JEFFRIES und J.C.F.
POOLE
- 116) RIZACK, M.A. J. Biol. Chem. 239, 392 (1964)
- 117) ENGELBERG, H. Metabolism 15, 796 (1966)

Ein Teil der Ergebnisse dieser Arbeit wurde veröffentlicht in:

SCHIEVELBEIN, H., V. LONDONG, W. LONDONG, H. GRUMBACH,
V. REMPLIK, A. SCHAUER und H. IMMICH

Nicotine and Arteriosclerosis Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 8,
190 (1970)

Herrn Prof. Dr. Dr. E. Werle gilt an dieser Stelle mein besonderer Dank. Seine Anleitungen zum wissenschaftlichen Arbeiten, die ich als medizinisch-technische Assistentin in seinem Laboratorium erfuhr, haben mich entscheidend zur Aufnahme des Medizinstudiums beeinflußt. Ich danke Herrn Prof. Werle für die Überlassung des Themas und für die wohlwollende Unterstützung während meines gesamten Studiums.

Herrn Prof. Dr. H. Schievelbein bin ich besonders dankbar für Kritik und Diskussion bei der Durchführung der experimentellen Untersuchungen.

Allen Mitarbeitern des Klinisch-Chemischen Institutes danke ich für kollegiale Unterstützung und erfreuliche Teamarbeit. Insbesondere danke ich Fräulein Karin Löschenkohl für bereitwillige Hilfe bei den Nikotin-Analysen und Fräulein Roswitha Pagel für geschickte Assistenz bei den tierexperimentellen und gaschromatographischen Untersuchungen.

Dem Margarine-Institut für gesunde Ernährung, Hamburg, danke ich für die Gewährung eines Stipendiums, mit dessen Hilfe der wesentliche Teil dieser Arbeit durchgeführt wurde.

Lebenslauf

Am 13.6.1933 wurde ich, Vera Londong geb. Schirren, als Tochter des Hautarztes Dr. Carl Georg Schirren und seiner Ehefrau Annelise geb. Reuter, als sechstes von sieben Kindern in Kiel geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule in Kiel und in Preetz/Holstein von 1940 bis 1945 besuchte ich die Internatsoberschule Schloß Plön bis 1951. 1952 beendete ich meine Schulzeit mit der Obersekundareife an der Ricarda-Huch-Schule in Kiel.

Am Hygiene Institut der Universität Kiel wurde ich von 1952 bis 1954 zur medizinisch-technischen Assistentin ausgebildet. Diesen Beruf übte ich von 1954 bis 1963 an Kliniken bzw. wissenschaftlichen Laboratorien in Kiel, München, Johannesburg/Südafrika und Pretoria/Südafrika aus.

1963 bestand ich am Bayerischen Staatsministerium für Unterricht und Kultus das Begabtenabitur und begann zum Wintersemester 1963/64 das Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München, wo ich im Mai 1966 die ärztliche Vorprüfung ablegte. Nach dem ersten klinischen Semester in München ging ich für drei Semester an die Universität Düsseldorf. Im Juli 1969 bestand ich an der Universität München das medizinische Staatsexamen.

Nach Ableistung der Medizinalassistentenzeit an der Chirurgischen Klinik, der II. Medizinischen Klinik und der I. Frauenklinik der Universität München erhielt ich im September 1970 die ärztliche Approbation.

Seit dem 7.10.1966 bin ich mit dem Arzt Dr. Walter Londong aus Vluyt verheiratet.

